

**Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen**

Aus der Klinik für Orthopädie

**Effekte von Osteoprotegerin und Simvastatin auf  
Polyethylenpartikel-induzierte Osteolysen  
im murinen Kalvariamodell**

**I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n**  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Anja Heckelei  
aus Bottrop  
2006

Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Jöckel

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. M. von Knoch

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. M. Wiemann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.September 2006

## I Publikationen

1. von Knoch, F., **Heckelei, A.**, Wedemeyer, C., Saxler, G., Hilken, G., Henschke, F., Löer, F., von Knoch, M. (2005): The effect of simvastatin on polyethylene particle-induced osteolysis. *Biomaterials* 26, 3549-3555.
2. von Knoch, F., Wedemeyer, C., **Heckelei, A.**, Saxler, G., Hilken, G., Brankamp, J., Sterner, T., Landgraeber, S., Henschke, F., Löer, F., von Knoch, M. 2005: Promotion of bone formation by simvastatin in polyethylene particle-induced osteolysis. *Biomaterials* 26 (29), 5783-5789.
3. von Knoch, F., **Heckelei, A.**, Wedemeyer, C., Saxler, G., Hilken, G., Henschke, F., Löer, F., von Knoch, M. 2005: Suppression of Polyethylene Particle-Induced Osteolysis by Exogenous Osteoprotegerin. *Journal of Biomedical Materials Research A* 75 (2), 288-294.
4. von Knoch, F., Wedemeyer, C., **Heckelei, A.**, Sprecher, C., Saxler, G., Hilken, G., Henschke, F., Bereiter, H., Löer, F., von Knoch, M.(2005): A comparison of the antiresorptive effects of bisphosphonates and statins polyethylene particle-induced osteolysis. *Biomedizinische Technik* 50 (6), 195-200.
5. von Knoch, M., von Knoch, F., **Heckelei, A.**, Wedemeyer, C., Saxler, G., Hilken, G., Henschke, F., Löer, F.: Pharmacologic Options to Treat Particle-Induced Osteolysis, 7<sup>th</sup> Essen Symposium on Biomaterials and Biomechanics: Fundamentals and Clinical Applications, October, 6<sup>th</sup> - 8<sup>th</sup>, 2004, University Duisburg-Essen, Campus Essen (Vortrag)
6. von Knoch, F., **Heckelei, A.**, Wedemeyer, C., Saxler, G., Hilken, G., Henschke, F., Löer, F., von Knoch, M.: The Effect of Simvastatin on Polyethylene Particle-Induced Osteolysis, 7<sup>th</sup> Essen Symposium on Biomaterials and Biomechanics: Fundamentals and Clinical Applications, October, 6<sup>th</sup> - 8<sup>th</sup>, 2004, University Duisburg-Essen, Campus Essen (Poster)

7. **Heckelei, A.**, von Knoch, F., Wedemeyer, C., Saxler, G., Hilken, G., Henschke, F., Löer, F., von Knoch, M.: Osteoprotegerin suppresses Polyethylene Particle-Induced Osteolysis, 3. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, 19.11.2004, Universitätsklinikum Essen (Poster)
8. von Knoch, F., **Heckelei, A.**, Wedemeyer, C., Saxler, G., Hilken, G., Henschke, F., Löer, F., von Knoch, M. (2005): Simvastatin reduces polyethylene particle-induced osteolysis. 0151, Orthopaedic Research Society, Transactions Vol. 30, Washington, D.C.
9. von Knoch, F., **Heckelei, A.**, Wedemeyer, C., Saxler, G., Hilken, G., Henschke, F., Löer, F., von Knoch, M. (2005): Osteoprotegerin suppresses polyethylene particle-induced osteolysis. 1624, Orthopaedic Research Society, Transactions Vol. 30, Washington, D.C.



## **Meiner Familie**

## II Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1	Pathogenese der Prothesenlockerung.....	8
1.2	Osteoklasten.....	9
1.3	Mechanismen der Osteoklastenbildung und -Aktivität.....	10
1.3.1	RANKL.....	10
1.3.2	RANK.....	10
1.3.3	Osteoprotegerin.....	11
1.3.4	Das OPG/ RANKL/ RANK-System.....	12
1.4	Klinische Bedeutung der Prothesenlockerung.....	13
1.5	Cholesterolbiosynthese.....	13
1.6	Bisphosphonate.....	14
1.7	Simvastatin.....	14
1.8	Fragestellung der Arbeit.....	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.1	Tiermodell zur partikelinduzierten Osteolyse.....	17
2.1.1	Versuchsprinzip.....	17
2.1.2	Versuchstierhaltung.....	17
2.1.3	Tieranzahl.....	18
2.1.4	Polyethylenpartikel.....	18
2.1.5	Polyethylenpartikelaufbereitung.....	19
2.2	Osteoprotegerin.....	21
2.3	Simvastatin.....	21
2.4	Partikelimplantation.....	22
2.4.1	Narkose und OP Vorbereitung.....	22
2.4.2	Operation.....	22
2.4.3	Postoperative Schmerztherapie.....	23
2.4.4	Applikation von Osteoprotegerin.....	23
2.4.5	Gabe von Simvastatin.....	23
2.4.6	Visiten.....	23
2.4.7	Euthanasierung der Versuchstiere.....	
	24	
2.5	Präparation und Entnahme der Calvaria.....	24

2.6	Histologische Aufbereitung.....	24
2.7	Färben der Präparate.....	26
2.8	Auswertung.....	28
2.8.1	Bildanalyzesystem.....	28
2.8.2	Qualitative Beschreibung der histologischen Präparate.....	28
2.8.3	Quantitative Auswertung der histologischen Präparate.....	29
2.9	Statistik.....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
3.1	Qualitative histologische Analyse der Knochenschnitte.....	34
3.2	Quantitative histologische Analyse der Knochenschnitte.....	41
3.2.1	Mittelliniensuturfläche.....	41
3.2.2	Osteoklastenanzahl.....	42
3.2.3	Gewebeverteilung.....	43
3.2.4	Kortikale Knochendicke.....	45
3.2.5	Knochenneubildung.....	46
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>48</b>
4.1	Versuchsmodell.....	48
4.2	Osteoprotegerin.....	49
4.3	Statine.....	50
4.4	Statine und Bisphosphonate im Vergleich.....	53
4.5	Grenzen des Modells.....	53
4.6	Ausblick.....	54
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>Anhang: Abbildungen ,Tabellen, Histologie.....</b>	<b>66</b>
7.1	Tabellen.....	66
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>72</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Pathogenese der Prothesenlockerung

Periprotetische Osteolysen mit daraus folgender aseptischer Prothesenlockerung sind die häufigste und bedeutendste Langzeitkomplikation der Hüftendoprothetik (Rubash et al. 1998, Schmalzried et al. 1992, Sinha et al. 1998).

Eine pathogenetisch wichtige Ursache der aseptischen Prothesenlockerung sind Abriebpartikel. Je nach Prothesentyp entstehen vor allem Polyethylenpartikel wie Ultra-high-molecular-weight-polyethylene-(UHMWPE)-Partikel, gefolgt von Polymethylmetacrylat-(PMMA)-Knochenzement-Partikeln, Titanpartikeln und Knochenabriebpartikeln (Jacobs et al. 2001). Die Hauptpartikelgröße liegt bei 0,5µm, 90% aller im periprotetischen Gewebe gefundenen Partikel sind kleiner als 1µm (Jacobs et al. 2001).

Die jeweiligen Abriebpartikel gelangen in die freie Gelenkhöhle und durch Phagozytose in die nach totaler Resektion neu gebildete Gelenkkapsel. Makrophagen phagozytieren die Abriebpartikel an der Knochen-Implantat-Grenze und werden dadurch aktiviert. Hierdurch kommt es zur Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen, z. B. Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF-alpha), Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) (Schwarz et al. 2000). Im Allgemeinen geht man davon aus, dass diese Zytokine über die Stimulation von Osteoklasten Osteolysen verursachen. Sie initiieren eine osteolytische Kaskade mit einer periprotetischen granulomatösen Entzündung und daraus resultierender Knochenresorption durch Osteoklasten (Rubash et al. 1998, Schmalzried et al. 1992, Sinha et al. 1998, Willert et al. 1972-1981). Von vielen Autoren wird daher der Osteoklast als essentiell für die Knochenresorption angesehen (Mundy 1993, Teitelbaum et al. 1995, Suda et al. 1997, Mundy 1999, Amling et al. 2000).

Die Lockerung der Hüftpfanne entsteht durch Knochenresorption am Äquator, die zum Pol der Pfanne fortschreitet. Diese Knochenresorption ist das Resultat einer Reaktion von aktivierten Makrophagen auf UHMWPE-Partikel-Wanderung entlang der Knochen-Implantat-Grenze. Der resorbierte Knochen wird durch eine Bindegewebsmembran ersetzt. Diese Bindegewebsmembran kann in Röntgenaufnahmen als Aufhellungssaum um die Pfanne identifiziert werden. Daraus folgt, dass die aseptische Pfannenlockerung vorwiegend biologischer und nicht mechanischer Natur ist (Schmalzried et al. 1992).

### *Knochenstoffwechsel*

Der Knochen ist ein stabiles Organ, das permanent Belastungen durch Zug- und Druckkräfte standhalten muss. Gleichzeitig ist der Knochen ein dynamisches, flexibles Organ, das sich den Gegebenheiten und unterschiedlichen Anforderungen anpasst. Diese Anpassung ist möglich, weil der Knochen permanent Umbauprozessen unterworfen ist, die sich aus einem Gleichgewicht von Abbau (Resorption) und Aufbau (Synthese) zusammensetzen. Schlüssel zu diesen Umbauprozessen sind Osteoklasten und Osteoblasten und die Regulation ihrer Aktivität (Chambers 2000, Teitelbaum 2000).

## **1.2 Osteoklasten**

Osteoklasten sind mehrkernige Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Sie entstammen pluripotenten Knochenmarksstammzellen, die sich in Folge gewisser Stimuli und unterschiedlicher Wachstumsfaktoren in Granulozyten, Monozyten oder Osteoklasten-Vorläuferzellen differenzieren. Die einkernigen Osteoklasten-Vorläuferzellen zirkulieren im Blut und lagern sich endostalen Knochenoberflächen an. Dort proliferieren sie, fusionieren zu mehrkernigen Zellen und bilden einen Bürstensaum, „ruffled border“ genannt, aus (Mundy 1999).

Die wichtigste Funktion des Osteoklasten im Knochenstoffwechsel ist die Knochenresorption. Zu diesem Zweck produziert der Osteoklast proteolytische Enzyme und Wasserstoffionen. Die Wasserstoffionen werden in der Zelle durch die Carboanhydrase synthetisiert und über Protonenpumpen in den Membranabschnitten der ruffled border in das extrazelluläre Resorptionskompartiment sezerniert. Sie schaffen ein saures Milieu, das nötig ist, damit die lysosomalen Enzyme (Cystein Proteasen, Kathepsine, Kollagenasen) Hydroxyapatitkristalle aus der Knochenmatrix lösen und Kollagenfasern abbauen können (Mundy 1993-1999).

Die molekularen Mechanismen zur Kontrolle der Osteoklastenbildung und Osteoklastenaktivität sowie die Interaktion von Osteoklasten und Osteoblasten können durch das Zusammenspiel dreier Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie erklärt werden: RANKL (receptor-activator of NFκB-Ligand), RANK (receptor-activator of NFκB) und OPG (Osteoprotegerin).

### 1.3 Mechanismen der Osteoklastenbildung und Osteoklastenaktivität

#### 1.3.1 RANKL

RANKL, „receptor-activator of NF $\kappa$ B-Ligand“, ist ein Protein aus 317 Aminosäuren, das sowohl als membrangebundene Form mit 40 bis 45 Kilodalton als auch als lösliche Form mit 31 Kilodalton nach der Abspaltung an Position 140 bzw. 145 im menschlichen Organismus vorliegt (Lacey et al. 1998). Es ist der Faktor zur Osteoklastendifferenzierung, der auf Präosteoblasten exprimiert wird. Die höchste Expression von RANKL mRNA konnte im Knochenmark und im lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Thymus, Milz, Fetale Leber, Peyer Plaques) nachgewiesen werden (Lacey et al. 1998, Yasuda et al. 1998, Wong et al. 1997, Anderson et al. 1997). Die wichtigste Rolle für RANKL im Knochenmetabolismus ist die Stimulierung der Osteoklastendifferenzierung (Malyankar et al. 2000, Lacey et al. 1998), ihrer Aktivität und die Hemmung der Apoptose von Osteoklasten (Fuller et al. 1998). Mit der Anwesenheit niedriger Konzentrationen von Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF) scheint RANKL für die vollständige Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen in reife Osteoklasten notwendig zu sein (Lacey et al. 1998, Yasuda et al. 1998). Zusätzlich hat RANKL zahlreiche Auswirkungen auf Immunzellen, wie z. B. die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) in T-Zellen (Wong et al. 1997), die Hemmung der Apoptose dendritischer Zellen (Wong et al. 1997), die Induktion der Cluster-Bildung dendritischer Zellen und Effekte auf die Zytokin-aktivierte T-Zell-Proliferation (Anderson et al. 1997).

In einer 1999 von Kong et al. erschienenen Studie wurden diese Erkenntnisse im Experiment mit RANKL Knockout-Mäusen bestätigt: es konnte eine gravierende Osteopetrose nachgewiesen werden. Ebenso kam es zu einem vollständigen Fehlen von Osteoklasten. Die Mäuse zeigten Defekte in der frühen Differenzierung von T- und B-Zellen sowie des Thymus, das Fehlen von Lymphknoten. Jedoch hatten diese Mäuse eine normale Milzstruktur und normale Peyer Plaques. Unerwartet waren jedoch Defekte in der Brustdrüsenentwicklung. Teilweise wurden lobuläre Strukturen während der Schwangerschaft fehlgebildet, was zum Tod der Neugeborenen führte (Fata et al. 2000).

#### 1.3.2 RANK

Humanes RANK ist ein Protein bestehend aus 616 Aminosäuren mit einem 28 Aminosäuren zählenden Signal-Peptid. Das N-terminale Ende bildet die extrazelluläre Domäne. Die transmembrane Domäne besteht aus 21 Aminosäuren und das C-terminale

Ende bildet den großen zytoplasmatischen Anteil des Proteins (Anderson et al. 1997). RANK wird exprimiert auf Zellen der Makrophagen-/Monozytenreihe - inklusive den Osteoklasten-Vorläuferzellen, auf T- und B-Zellen, dendritischen Zellen und Fibroblasten (Anderson et al. 1997, Hsu et al. 1999).

RANK, „receptor-activator of NF- $\kappa$ B“, ist der Rezeptor für RANKL (Anderson et al. 1997). Hsu et al. konnten 1999 zeigen, dass RANK mRNA in hohen Konzentrationen von isolierten, aus dem Knochenmark stammenden Osteoklasten-Vorläuferzellen und reifen Osteoklasten in vivo exprimiert wird. Ebenso konnte bei transgenen Mäusen, die ein lösliches RANK-Fc Fusionsprotein exprimierten, deutliche Osteopetrose nachgewiesen werden. Die Mäuse zeigten einen ähnlichen skeletalen Phänotyp wie transgene OPG-Mäuse.

RANK ist der einzige Rezeptor für RANKL auf Osteoklasten-Vorläuferzellen. Den Beweis dafür erbrachten Li et al. 2000 mit RANK-Knockout Mäusen, bei denen es zu schwerwiegender Osteopetrose kam, die durch das Fehlen von Osteoklasten vermittelt war. Durch den Rück-Transfer von RANK cDNA in hämatopoetische Stammzellen dieser Knockout-Mäuse konnte die Osteoklastenbildung initiiert werden. Ebenso wie bei RANKL-Knockout Mäusen zeigten sich auch bei den RANK-Knockout Mäusen fehlende Lymphknoten und Defekte in der T- und B-Zell-Entwicklung, der Thymus war jedoch normal ausgebildet (Li et al. 2000).

### **1.3.3 Osteoprotegerin**

Osteoprotegerin (OPG) ist ein Protein aus 401 Aminosäuren. Nach der Abspaltung eines Propeptids mit 21 Aminosäuren setzt sich die aktive Form von OPG noch aus 380 Aminosäuren zusammen (Simonet et al. 1997, Yasuda et al. 1998). Es gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor-(TNF)-Rezeptoren und liegt sowohl als Typ II-Transmembranprotein (Yun et al. 1998) als auch als gelöstes Protein (Emery et al. 1998) vor. Simonet et al. 1997 und Yasuda et al. 1998 fanden OPG mRNA in zahlreichen Geweben wie der Lunge, dem Herz, der Niere, der Leber, dem Magen und Darm, dem Gehirn und Rückenmark, der Schilddrüse sowie auch dem Knochen vor. Ebenfalls eine zentrale Rolle scheint das OPG im Gefäßsystem zu spielen. Bucay et al. fanden bei Mäusen mit einem gezielten OPG-Mangel nicht nur eine starke Osteoporose aufgrund einer hohen Aktivität von Osteoklasten, sondern auch eine gravierende Verkalkung der großen Arterien mit deutlicher Proliferation von Intima und Media sowie teilweiser

Aortendissektion im Alter von 4 Monaten (Bucay et al. 1998). Malyankar et al. haben herausgefunden, dass OPG ein wichtiger Überlebensfaktor für Endothelzellen sein kann (Malyankar et al. 2000).

#### **1.3.4 Das OPG/ RANKL/ RANK System**

Durch das Zusammenspiel von OPG, RANKL und RANK wird die Osteoklastogenese kontrolliert. RANKL wird auf der Oberfläche von Osteoblasten-Vorläuferzellen exprimiert und bindet an RANK, das auf der Oberfläche von Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimiert wird. Ebenfalls auf der Oberfläche der Osteoklasten-Vorläuferzellen befindet sich der c-Fms-Rezeptor und der Rezeptor für den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor, M-CSF. M-CSF ist notwendig für die Osteoklastenentwicklung, da er die Hauptdeterminante für den Pool an Osteoklastenvorläuferzellen darstellt (Udagawa et al. 1990). RANKL ist essentiell für die Differenzierung von Osteoklasten, die Fusion zu multinukleären Zellen, ihre Aktivierung und das Überleben von Osteoklasten.

OPG bremst dieses System durch die Hemmung der RANKL-bezogenen Effekte, indem es selbst an RANKL auf den Osteoblasten-Vorläuferzellen bindet. Ebenfalls beeinflusst wird dieses System durch eine Anzahl von proresorptiv wirkenden Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und Interleukin 1, IL-1. Sie modulieren das System hauptsächlich durch die Stimulierung der M-CSF-Produktion, aber auch durch die direkte vermehrte RANKL-Expression (Hofbauer et al. 1999). Eine weitere Anzahl an Zytokinen und Hormonen nehmen Einfluss auf die Osteoklastogenese durch Regulation der OPG- und RANKL-Produktion der Osteoblasten. TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) erhöht die OPG-Produktion (Takai et al. 1998), Parathormon erhöht die RANKL-Produktion und hemmt gleichzeitig die OPG-Produktion (Lee et al. 1999), dieselbe Wirkung haben Glukokortikoide (Hofbauer et al. 1999). Ebenfalls mit einer vermehrten RANKL-Produktion äußert sich der Einfluss von 1,25-Dihydroxycholecalciferol. Vitamin D3 (Kitazawa et al. 1999) und Östrogene steigern die OPG-Produktion (Hofbauer et al. 1999, Saika et al. 2001). Eine direkte Wirkung auf den Osteoklasten, die nicht über den Osteoblasten läuft, hat Calcitonin (Nicholson et al. 1986). Östrogen induziert die Apoptose von Osteoklasten (Hughes et al. 1996) und hemmt die Osteoklastendifferenzierung durch die Störung der RANK-Signalkette (Shevde et al. 2000, Srivastava et al. 2001). TGF- $\beta$  stimuliert die RANK Expression auf Osteoklasten-Vorläuferzellen, was die Sensitivität von Osteoklasten gegenüber RANKL steigert (Yan et al. 2000).



Gori et al. haben herausgefunden, dass die Fähigkeit der Osteoblasten-Vorläuferzellen, die Osteoklastenentwicklung zu unterstützen, schnell im Verlauf ihrer eigenen Entwicklung zum reifen Osteoblasten durch die abnehmende RANKL-Produktion und die steigende OPG-Produktion verloren geht (Gori et al. 2000). Diese Tatsache macht im Hinblick auf den Zellverband „Knochen“ auch Sinn, denn wo frühe Osteoblasten die Bildung und Differenzierung von Osteoklasten fördern, wäre es kontraproduktiv für reife Osteoblasten an der gleichen Stelle Osteoid zu produzieren, wenn Osteoklasten dieses sofort wieder zerstören.

#### **1.4 Klinische Bedeutung der Prothesenlockerung**

Es sind bisher enorme Anstrengungen unternommen worden, der Komplikation der aseptischen Prothesenlockerung vorzubeugen, wie u. a. die Entwicklung besserer Materialhaltbarkeit z. B. durch hochvernetztes UHMWPE und alternative Artikulationen (Premnath et al. 1999, McKellop et al. 1999, Muratoglu et al. 2001).

Angesichts dieser Anforderungen an die Prothesenchirurgie wären nichtinvasive Alternativen zur Prophylaxe und Therapie periprotehtischer Osteolysen wünschenswert. Das zunehmende Verständnis der molekularen Mechanismen der Abriebpartikel-induzierten Osteolysen ermöglicht die pharmakologische Intervention (Vonau et al. 2001, Fisher et al. 1999).

Aus den bereits genannten Zusammenhängen der Osteoklastenregulation durch das OPG/ RANK/ RANKL-System sowie der Osteoklastenaktivierung durch aktivierte Makrophagen aufgrund von Polyethylenpartikeln könnte Osteoprotegerin eine Option zur Prävention von Prothesenlockerungen sein.

Eine weitere Option zur pharmakologischen Intervention ergibt sich aus einem anderen Stoffwechselweg, der mit dem Knochenstoffwechsel interagiert: dem Mevalonatstoffwechsel, einem Teil der Cholesterolbiosynthese. Die bekannteste Wirkstoffgruppe zur Hemmung von Knochenresorption, deren Wirkmechanismus in diesen Stoffwechselweg eingreift, sind die Bisphosphonate.

#### **1.5 Cholesterolbiosynthese**

Das Cholesterol gehört zur Gruppe der Isoprenoide, deren Synthese mit Acetyl-CoA beginnt. Die Biosynthese des Cholesterol kann in 4 Abschnitte eingeteilt werden. Zunächst entsteht aus drei Molekülen Acetyl-CoA über das Zwischenprodukt 3-Hydroxy-3-

methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) Mevalonat. Dieser Syntheseschritt wird durch die HMG-CoA-Reduktase katalysiert. Gleichzeitig ist dies der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Cholesterolsynthese. Im nächsten Abschnitt wird unter ATP-Verbrauch durch Decarboxylierung aus Mevalonat Isopentyl-diphosphat. Im 3. Abschnitt wird aus dem Isopentyl-diphosphat über Geranyl-diphosphat durch die Farnesyl-pyrophosphat-Synthase Farnesyldiphosphat. Zwei Moleküle Farnesyl-diphosphat bilden durch Kondensation das Squalen, aus dem im 4. und letzten Schritt dann Cholesterol synthetisiert wird (Taschenatlas der Biochemie, Biochemie Karlson).

## 1.6 Bisphosphonate

Der Mechanismus der Bisphosphonate ist die Hemmung der Farnesyl-pyrophosphat-Synthase. Dadurch wird die Synthese von Isoprenoiden und ihren Vorstufen verhindert. Die Konsequenz ist, dass bestimmte Proteine, unter anderem das GTP-bindende Protein Ras, nach der Translation nicht durch die Prenylierung mit Farnesyl- und Geranylgeraniol-Isoprenoiden modifiziert werden können. Dieser Mechanismus führt zur Abnahme der Osteoklastenaktivität und kann auch zur Apoptose des Osteoklasten führen (Luckmann et al. 1998, Fisher et al. 1999, van Beek et al. 1999).

Die Hauptwirkung der Bisphosphonate ist die Hemmung der Osteoklasten-vermittelten Knochenresorption. Shanbhag et al. konnten in einem Modell mit Hüft-Total-Endoprothesen bei Kaninchen zeigen, dass die orale Alendronat-Behandlung die Abriebpartikel-induzierte Knochenresorption hemmen kann (Shanbhag et al. 1997). Durch von Knoch et al. wurde erst kürzlich ein Modell zur Polyethylenpartikel-induzierten Osteolyse an murinen Kalvaria eingeführt (von Knoch et al. 2004), an dem gezeigt wurde, dass Zoledronat, ein Bisphosphonat der dritten Generation, die Partikel-induzierte Knochenresorption deutlich reduziert (von Knoch et al. 2005). Diese Erkenntnisse werden durch Ergebnisse aus klinischen Studien von Venesmaa et al. 2001 und Wang et al. 2003 unterstützt, die unter dem Einsatz von Bisphosphonaten eine verbesserte Fixation und Haltbarkeit von Totalendoprothesen beim Menschen fanden.

## 1.7 Simvastatin

Der pharmakologische Mechanismus von Simvastatin steht ebenso wie der der Bisphosphonate in Beziehung mit dem Mevalonatstoffwechsel. Simvastatin ist eine Vorstufe eines Inhibitors der HMG-CoA-Reduktase, des Schlüsselenzyms der Cholesterolsynthese. Aus diesem Grund werden Statine wie Simvastatin bisher

eingesetzt um den Serum-Cholesterol-Spiegel und somit auch das Risiko von Herzinfarkten zu senken (Farnier et al. 1998).

Mundy et al. zeigten als erste, dass Statine wie Simvastatin und Lovastatin fähig sind den Knochenaufbau sowohl in vitro als auch in vivo, zu steigern (Mundy et al. 1999). Der Mechanismus, durch den Statine die Knochenneubildung stimulieren, besteht in einer erhöhten Expression der Bone morphogenetic protein 2-(BMP-2)-mRNA und damit auch von BMP-2 (Mundy et al. 1999). BMP-2 ist ein Mitglied der Transforming growth factor  $\beta$ -Familie, die eine bedeutende Rolle bei der Frakturheilung und der Knochenregeneration spielt (Wozney et al. 1989). Zusätzlich kommt es zu einer erhöhten Produktion von mRNA der alkalischen Phosphatase sowie eine daraus folgende vermehrte Aktivität der alkalischen Phosphatase. Durch Simvastatin kommt es zu einer Hemmung der Kollagenase 1 und somit zu einer Akkumulation von Kollagen 1, was zu einer vermehrten Mineralisierung des neu gebildeten Knochens führt (Maeda et al. 2001).

Es gibt noch eine andere Beobachtung, die einen weiteren Aspekt zur Erklärung der zunehmenden Knochenneubildung unter Simvastatintherapie liefern könnte. Eine Studie von Kureishi et al. 2000 zeigt auf, dass Simvastatin zu einer steigenden Produktion von Phosphatidylinositol 3, 4, 5- triphosphat führt, die Proteinkinase B Akt/PKB aktiviert und die Phosphorylierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase steigert. Dies führt in den Endothelzellen zu gesteigerter Stickstoffmonoxid-(NO)-Produktion. NO wiederum fördert die Angiogenese. Maeda et al. schlossen aus der Beobachtung, dass verschiedene Wachstumsfaktoren - wie z. B. VEGF (vascular endothelial growth factor) und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor), die ebenfalls die Knochenneubildung fördern (Gerber et al. 1999, Canalis et al. 1988) - fähig sind die Angiogenese zu fördern und dass die gesteigerte Knochenneubildung durch Simvastatin durch die Mechanismen der Angiogenese vermittelt werden könnte (Maeda et al. 2001).

Ebenso ist die Fähigkeit der Statine beschrieben worden, sowohl in vitro (Fisher et al. 1999, Luckmann et al. 1998, Staal et al. 2003) als auch in vivo Osteoklasten-vermittelte Knochenresorption zu supprimieren (Mundy et al. 1999). Dieser Effekt kann auf die Interaktion mit dem Mevalonatstoffwechsel zurückgeführt werden. Wie auch bei den Bisphosphonaten resultiert die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase in der Hemmung der Protein-Prenylierung (Zhang et al. 1996). Staal et al. konnten 2003 nachweisen, dass Statine die Knochenresorption in vitro hemmen und dass diese Fähigkeit direkt mit ihrer Potenz korreliert die HMG-CoA-Reduktase zu hemmen.

## **1.8 Fragestellung der Arbeit**

Resultierend aus den pathophysiologischen Erkenntnissen zur Prothesenlockerung und zu den Wirkungen und Wirkungsmechanismen von Osteoprotegerin und Simvastatin wurde die Hypothese aufgestellt, dass sowohl Osteoprotegerin als auch Simvastatin die durch UHMWPE-Partikel induzierten Osteolysen im Mausealvaria-Modell hemmen können.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tiermodell zur partikelinduzierten Osteolyse**

#### **2.1.1 Versuchsprinzip**

Wir verwendeten ein Modell, in dem durch Polyethylenpartikel an den Mäusekalvaria Osteolysen induziert wurden, wie es von unserer Arbeitsgruppe schon einmal beschrieben wurde (von Knoch M. et al. 2005). Dazu wurden 35 männliche gesunde 9 Wochen alte C57 BL/J6 Mäuse randomisiert auf 5 Gruppen verteilt. Gruppe I bildete die Kontrollgruppe und erhielt keine Polyethylenpartikel. Den Gruppen II, III, IV und V wurden 30µl Polyethylenpartikel auf das Periost der Kalvaria implantiert. Gruppe II wurde nach der Operation keiner weiteren Behandlung unterzogen. Direkt postoperativ erhielt Gruppe III täglich 3mg/kg Körpergewicht Osteoprotegerin s.c. Gruppe IV erhielt ab dem 5. postoperativen Tag täglich Osteoprotegerin in derselben Dosierung, und Gruppe V bekam unmittelbar postoperativ über die gesamte Versuchszeit hinweg 120mg/kg Körpergewicht/Tag Simvastatin über das Futter. 14 Tage nach der Operation wurden die Tiere euthanasiert um den Knochen der Mausschädel histologisch aufzubereiten und histomorphometrisch auszuwerten.

#### **2.1.2 Versuchstierhaltung**

Die Tiere wurden von der Firma Jackson Mice bezogen und im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen (Leiter: Prof. Dr. med. vet. K. Militzer) im Einklang mit den Richtlinien der Universität Duisburg-Essen und der Landesregierung Nordrhein-Westfalens/ Düsseldorf gehalten. Es lag ein genehmigter Antrag auf Tierversuch (Nr. G 730/03) vor.

Die Tiere wurden standardisiert gehalten in einem festgelegten Tag-Nacht-Rhythmus (12 Stunden hell, 12 Stunden dunkel), bei einer Raumtemperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{Celsius}$  und einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 5\%$  bei einer 15-fachen Luftumwälzung pro Stunde. Für den gesamten Versuchszeitraum wurden die Tiere einzeln in Kunststoffkäfigen gehalten um Stress und Infektionen vorzubeugen. Die Streu wurde täglich gewechselt, Wasser und artgerechtes Futter standen den Tieren jederzeit in ausreichender Menge zur Verfügung.

### 2.1.3 Tieranzahl

In unserer Studie wurden 7 Tiere pro Gruppe eingesetzt um eine statistische Aussage treffen zu können. Diese Anzahl ergab sich aus einer Power Analyse des Department of Biostatistics der Mayo Clinic, Rochester, Minnesota.

### 2.1.4 Polyethylenpartikel

Es wurden kommerziell hergestellte Ceridust®-Polyethylenpartikel vom Typ VP 3610 (Firma Clariant, Gersthofen, Deutschland) verwendet, die von der Firma kostenfrei zur Verfügung gestellt wurden. Den Herstellerangaben zufolge sind 50% der Partikel kleiner als 5µm und 90% kleiner als 9µm.

Von Knoch et al. führten eine morphologische Analyse dieser kommerziell erhältlichen Polyethylenpartikel durch, um die Verteilung der Partikelgrößen zu verifizieren und in einem Vergleich zu Polyethylenpartikeln aus Hüftsimulatorexperimenten die Eignung für in-vitro- und in-vivo-Experimente zu prüfen. Dazu wurden die Partikel in ultrareinem H<sub>2</sub>O suspendiert und jeweils 10ml dieser Suspension mit 40ml 37% Salzsäure bei 50°C für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurde 1ml dieser Lösung in 100ml Ethanol überführt und mit einem 0,1µm Polycarbonfilter (Millipore, Bedford, MA, USA) gefiltert. Nach der Trocknung wurde der Filter mit den zurückgehaltenen Partikeln mit 10nm Gold/ Palladium (Au/ Pd = 80%/ 20%) beschichtet und elektronenmikroskopische Aufnahmen (Niedrigspannung, 3-5kV; Hitachi FESEM S-4100, Kyoto, Japan) angefertigt.

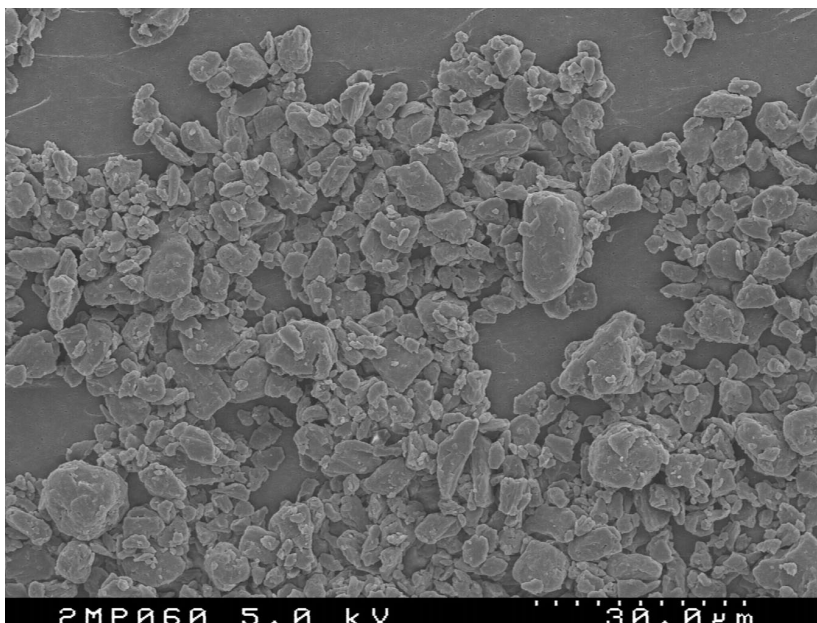


Abbildung 1: Polyethylenpartikel, 1000x Vergrößerung, elektronenmikroskopische Aufnahme

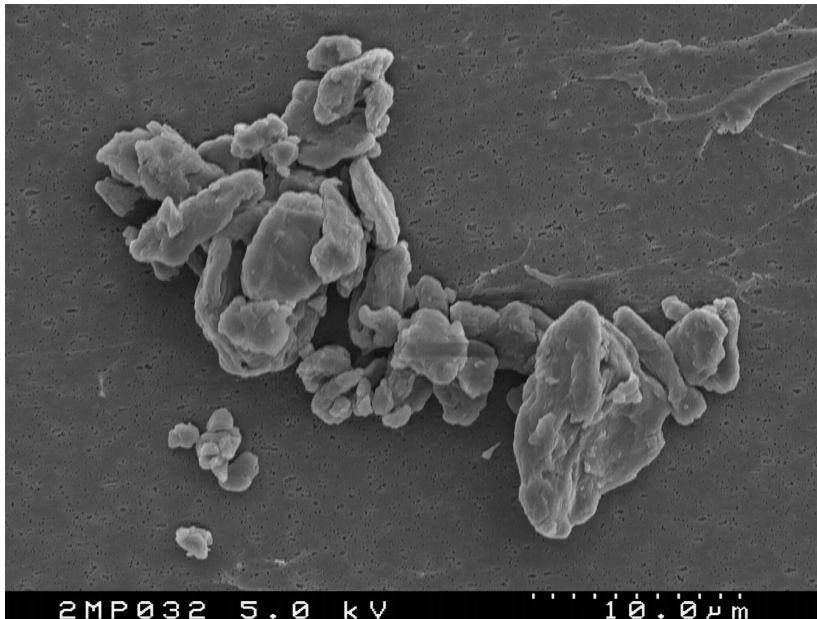


Abbildung 2: Polyethylenpartikel, 2750x Vergrößerung, elektronenmikroskopische Aufnahme

Mit dem Programm PC-Image (Version 2.2.03, Foster Findlay Associates Ltd, Newcastle upon Tyne, Großbritannien) wurden Fläche und Umfang der Polyethylenpartikel semiautomatisch ermittelt und mit den Polyethylenpartikeln aus dem Hüftsimulator verglichen. (Sprecher et al. 2003).

Die Analyse ergibt, dass 35% der Ceridust Polyethylenpartikel kleiner als  $1\mu\text{m}$  waren. Die durchschnittliche Partikelgröße betrug  $1,75\pm 1,43\mu\text{m}$  (von Knoch et al. 2004).

### **2.1.5 Polyethylenpartikelauflbereitung**

Zunächst wurden die Polyethylenpartikel mit Ethylenoxid sterilisiert. Anschließend wurden die Partikel in der sterilen Kammer („Laminar box“) in einem Schüttelbad mit 70% Alkohol gewaschen. Nach 24 Stunden wurde der Alkohol abzentrifugiert und durch neuen 70% Alkohol ersetzt. Die Partikel wurden darin weitere 24 Stunden gewaschen. Diese Waschung diente der Entfernung von Endotoxinen. Der Alkohol wurde ein weiteres Mal abzentrifugiert und die Partikel wurden im Desikator getrocknet und in endotoxinfreien Proberöhrchen (Firma Falcon, Franklin Lakes, USA) gelagert.

*Limulus-Amöbozyten-Assay*

Zum Nachweis der Endotoxinfreiheit der Polyethylenpartikel führten wir einen Limulus-Amöbozyten-Assay (Charles River, Kent, Großbritannien) durch. Dieser Assay enthält ein Limulus-Amöbozyten-Lysat, das aus gereinigten Amöbozyten des Pfeilschwanzkrebses gewonnen wird und zur qualitativen Bestimmung gramnegativer bakterieller Endotoxine durch gerinnungsbedingte Gelbildung dient (Gel Clot).

Das Prinzip des Limulus-Amöbozyten-Assays beruht auf einer Entdeckung von Frederick Bang. Er stellte fest, dass Bakterien im Pfeilschwanzkrebs (*Limulus polyphemus*) eine intravaskuläre Gerinnung auslösen (Bang 1956). Gemeinsam mit Levin entdeckte Bang auch den nachfolgend beschriebenen Mechanismus. Die Koagulationsreaktion wird durch einen Wirkstoff ausgelöst, der in den Amöbozyten, den zirkulierenden Blutzellen des Pfeilschwanzkrebses, vorhanden ist und der in Anwesenheit von bakteriellen Endotoxinen eine Trübung und Gelierung des Amöbozytenlysates durch einen enzymatischen Prozess bewirkt (Levin und Bang 1968).

Alle Verdünnungen wurden mit endotoxinfreiem Aqua dest. durchgeführt. Es wurde nur mit pyrogenfreien Pipettenspitzen, Pipetten und Röhrchen gearbeitet. (Endosafe Limited Charles River, Endosafe Tubes (13x100 mm) Depyrogenated Tubes Tested to < 0,001 EU/ml, Kent/England)

Der Standard wurde auf Raumtemperatur gebracht, mit dem Vortexer gerührt und in die endotoxinfreien Röhrchen überführt.

Aus diesem Standard wurde eine Verdünnung hergestellt, die einer Konzentration von 10 EU/ml entsprach.

Hier: 0,5ml aus Standard mit 3,5ml H<sub>2</sub>O = 10 EU/ml (1:8).

Aus dieser Verdünnung wurde wiederum eine 1:10 Verdünnung hergestellt, so dass die Gebrauchsverdünnung eine Konzentration von 1EU/ml enthielt.

Hier: 250µl aus Standard I mit 2,5ml H<sub>2</sub>O = 1 EU/ml (1:10).

Im zweiten Arbeitsschritt wurden die LAL Röhrchen gefüllt:

- |                      |   |
|----------------------|---|
| (1) Negativkontrolle | = ein Röhrchen mit 200µl dest.                              |
| (2) Positivkontrolle | = ein Röhrchen 100µl dest.+ 100µl 1. Standardverdünnung     |
| (3) Proben           | 1. Röhrchen : 200µl Probe                                   |
|                      | 2. Röhrchen : 100µl + 100µl 1.                              |
|                      | Standardarbeitsverdünnung (diente als Produktkontrolle, zum |
| Nachweis eventuell   | vorhandener Hemmstoffe)                                     |



(4) Inkubation im 37° C warmen H<sub>2</sub>O Bad

PEP Probe	Negativ Kontrolle	Positiv Kontrolle
Negativ (-) [flüssig]	Negativ (-) [flüssig]	Positiv (+) [geliert]

## 2.2 Osteoprotegerin (OPG)

Das im Versuch verwendete Osteoprotegerin wurde uns von der Firma Amgen (Amgen, Thousand Oaks, Californien, USA) auf Antrag und nach Vertragsabschluss bereitgestellt. Hierbei handelte es sich um Fc-OPG, eine Form des humanen OPG, das mit seinem N-terminalen Ende an das C-terminale Ende der Fc-Domäne von humanem IgG<sub>1</sub> gebunden ist. Die im Versuch verwendete Dosis von 3mg/kg Körpergewicht pro Tag basiert auf einer Dosisangabe aus einer Studie von Redlich et al. 2004, die mit dieser Dosis bereits erfolgreich Knochenresorption im Tumor-Nekrose-Faktor-assoziierten Arthritis-Modell hemmen konnten.

Wir erhielten das OPG in flüssiger Form in Ampullen zu 1ml mit jeweils 10mg OPG/ml. 1ml OPG-Lösung wurde in 50ml Wasser für Injektionszwecke (aqua ad iniectionabilia, DeltaSelekt GmbH, Pfullingen, Deutschland) gelöst. Den Mäusen der Gruppe III wurden dem Durchschnittsgewicht von 26g entsprechend täglich 0,4ml der verdünnten OPG-Lösung subkutan ins Nackenfell injiziert. Die Mäuse der Gruppe IV erhielten dieselbe Dosis ab dem 5. postoperativen Tag.

## 2.3 Simvastatin - Zocor®

Das im Versuch verwendete Simvastatin war Zocor® forte 40mg (MSD, Dieckmann Arzneimittel GmbH, Haar, Deutschland). Simvastatin gehört zur Gruppe der Cholesterin-Synthese-Hemmer, es ist genauer ein 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A-(HMG-CoA)-Reduktase-Hemmer. Zocor® wird synthetisch aus einem Fermentationsprodukt des *Aspergillus terreus* hergestellt. Sonstige Bestandteile waren Butylhydroxyanisol (E 320), Ascorbinsäure, Citronensäure-Monohydrat, mikrokristalline Cellulose, vorverkleisterte Stärke, Magnesiumstearat, Laktose-Monohydrat, Talkum, Hypromellose, Hypromellose; Farbstoffe: Titandioxid (E 171), Eisen(III)-oxid (E 172) (Fachinformation Zocor®, 2002). Um den Tieren näherungsweise eine Dosis von 120mg/kg KG zu verabreichen, wurden Erfahrungen des Zentralen Tierlabors der Universitätsklinik zu Grunde gelegt, nach denen eine Maus im Alter zwischen 8 und 12 Wochen mit einem Körpergewicht zwischen 25 und

30g ca. 4-5g Futter pro Tag zu sich nimmt. Daraus ergab sich eine Dosis von 6600mg Simvastatin auf 10kg Futter, was 165 Filmtabletten Zocor forte 40mg entspricht. Diese 165 Filmtabletten wurden von der Firma Altromin in das Futter eingearbeitet (10kg Altromin 1324 mit 6600mg Simvastatin, Chargennummer 368, Altromin GMBH, Lage, Deutschland).

## **2.4 Partikelimplantation**

### **2.4.1 Narkose und OP-Vorbereitung**

Die Mäuse wurden mit einer Lösung aus 70-80mg/kg Körpergewicht Ketamin und 5-7mg/kg Xylazin in Natriumchloridlösung anästhesiert. Die Lösung wurde intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde zum Schutz der Augen vor Austrocknung und Mikrotraumen durch Haare sowie um Infektionen zu vermeiden ein ca. 0,3cm langer Streifen Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Roche, Basel, Schweiz) in die Augen gegeben. Dann wurde den Tieren das Fell über der Sagittalsutur rasiert und das Operationsfeld sorgfältig mit Cutasept F (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) desinfiziert. Um einer Auskühlung der Tiere vorzubeugen, wurden sie auf eine 37°Celsius warme Wärmeplatte gelegt.

### **2.4.2 Operation**

Die Operation wurde auf einem steril abgedeckten Tisch durchgeführt. Für die Operation wurden sterile Operationshandschuhe Peha-taft® (Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) sowie sterile Pinzetten und Nadelhalter (Luttermann, Essen, Deutschland) verwendet. Das Kopffell der Tiere wurde mit einem sterilen Einmalskalpell Größe 15 (Aesculap®, Tuttlingen, Deutschland) über der Sagittalsutur in einer Länge von ca. 10mm eingeschnitten und das Periost auf einer Fläche von 10x10mm<sup>2</sup> dargestellt. Dann wurden die sterilen und endotoxinfreien Polyethylenpartikel mit einem scharfen Löffel (Volumen: 30µl) auf das Periost gegeben und gleichmäßig verteilt. Gruppe I erhielt keine Partikel. Der Hautschnitt wurde mit monofilem Polyamid-Nahtmaterial Dafilon® der Stärke 4/0 (Braun, Aesculap AG & CO. KG, Tuttlingen, Deutschland) mit einer Einzelknopfnahnt vernäht. Nach Abschluss der Operation wurden die Tiere wieder auf die Wärmeplatte gelegt und nach dem Aufwachen aus der Narkose wieder in ihre Käfige gesetzt.

### **2.4.3 Postoperative Schmerztherapie**

Um eventuellen postoperativen Schmerzen vorzubeugen, injizierten wir den Tieren 0,1mg/kg Körpergewicht Buprenorphin (Temgesic®) subkutan vor dem Erwachen aus der Narkose.

### **2.4.4 Applikation von Osteoprotegerin**

Den Tieren der Gruppe III wurde direkt postoperativ 3mg/kg Körpergewicht Osteoprotegerin subkutan ins Nackenfell injiziert. Die weiteren OPG-Gaben erfolgten täglich einmal in derselben Dosierung. Ab dem 5. postoperativen Tag erhielt auch Gruppe IV 3mg/kg KG OPG täglich.

### **2.4.5 Gabe von Simvastatin**

Jedes Tier der Gruppe V erhielt postoperativ ca. 190g mit Simvastatin (Zocor®) angereichertes Futter, von dem es nach Belieben fressen konnte. Alle 5 Tage wurde das Futter abgewogen und wenn nötig eine abgemessene Menge Futter dazugegeben.

### **2.4.6 Visiten**

Es wurde täglich eine Visite durchgeführt. Anschließend wurden den Tieren der Gruppe III und ab dem 5. postoperativen Tag auch der Gruppe IV 3mg/kg Körpergewicht OPG injiziert.

Eine Maus aus Gruppe I wachte nicht aus der Narkose auf.

Bei allen anderen Tieren waren die Wunden reizlos, es traten keine Wundheilungsstörungen auf. Die Injektionsstellen zur Verabreichung des OPG zeigten keine lokalen Reaktionen. Die Augen der Tiere waren stets gut befeuchtet und es kam nicht zu Reizzuständen. Die Tiere befanden sich während des Versuchszeitraums in gutem Allgemein- und Ernährungszustand, Wasser und Futter, sowohl das reguläre Futter für Gruppe I-IV als auch das mit Simvastatin versetzte Futter für Gruppe V, wurden in ausreichendem Maße konsumiert. Es kam nicht zu Gewichtsverlusten. Die Fäden wurden postoperativ für die Dauer des Versuchs belassen, um die Tiere nicht unnötigem Stress auszusetzen. 34 Tiere überlebten die Versuchsdauer von 14 Tagen und wurden am 14. postoperativen Tag in der CO<sub>2</sub>-Kammer euthanasiert.

#### 2.4.7 Euthanasierung der Versuchstiere

14 Tage postoperativ wurden die Tiere aller 5 Gruppen in der CO<sub>2</sub>-Kammer euthanasiert.

#### 2.5 Präparation der Kalvaria

Zunächst wurde das Fell mit dem Unterhautfettgewebe zirkulär am Hals durchtrennt und stumpf von der darunter liegenden Faszie gelöst. Das Fell wurde vom Unterkiefer abpräpariert und anschließend der Übergang zwischen Kopf und Halswirbelsäule aufgesucht und durchtrennt. Danach wurden beide Processus mandibulares durchtrennt und der Unterkiefer konnte samt Muskulatur und Halsweichteilen entfernt werden. Vom Foramen magnum ausgehend wurde die Schädelbasis in der Medianlinie durchtrennt. Anschließend wurde ebenfalls vom Foramen magnum ausgehend die Schädelbasis in einer Linie durch den Meatus akustikus externus auf beiden Seiten entfernt, so dass das Gehirn sichtbar wurde. Dieses wurde ebenfalls entfernt und das Fell mit größter Vorsicht von der Schädeldecke abpräpariert. Die noch vorhandene Muskulatur wurde vorsichtig abgetragen und der Knochen kurz in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, bevor er in die Schaffer'sche Lösung (1440ml Methanol, 750ml Formalin 40% neutral und 60ml Puffer (9,6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2H<sub>2</sub>O; 1,74g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 30,8g Glucose; ad 1l Aqua dest.) gegeben wurde.

#### 2.6 Histologische Aufbereitung

Die Herstellung der Präparate sah eine viertägige Aufbereitung vor.

##### *1. Tag - Entwässerung in Aceton*

Am 1.Tag wurde der Knochen aus der Schaffer'schen Lösung genommen. Eine Stunde wurde der Knochen in 70% Aceton (70ml Aceton reinst + 30ml Citratpuffer (pH 6,0)), danach über Nacht in 5% Aceton (95ml Aceton reinst + 5ml Polyethylenglycol) entwässert.

##### *2. Tag - Einbetten des Knochens in den Kunstharz*

Zum Entstabilisieren von Methylmethacrylat + Butylmethacrylat wurden je 140g Aluminiumoxid 90 basisch in einen Filter gegeben und filtriert (1 Liter). Die entstabilisierten Harze wurden bei – 15° C aufbewahrt und der Boden mit Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub>) bedeckt.

Vor dem Ausgießen wurde der Knochen zweimal in Aceton für je 30 Minuten, zweimal in Xylol für je 30 Minuten und zweimal in einem Kunststoffgemisch bestehend aus 2 Teilen Methylmethacrylat + 3 Teilen Butylmethacrylat + 2% Polyethylenglycol 400 (PEG) für 45 Minuten getränkt.

Hier: *200ml Methylmethacrylat (MM) + 300ml Butylmethacrylat (BM) =  
500ml Gebrauchslösung + 10ml Polyethylenglycol (PEG)*

Der Schädelknochen wurde im Bereich des Operationsgebietes in vier Streifen von ca 2mm Breite geschnitten und mit der Frontalebene des Schädels auf dem Boden der Glasröhrchen aufgestellt. Für das Ausgießen der Glasröhrchen wurden zwei Lösungen benötigt.

Lösung A: 2 Teile Methylmethacrylat + 2% Benzoylperoxid

Hier: *200ml Methylmethacrylat + 4g Benzoylperoxid bei – 15° C haltbar*

Lösung B: 3 Teile Butylmethacrylat + 1% PEG + 1% N,N-Dimethyl-p-toluidin

Hier: *200ml Butylmethacrylat + 2ml PEG + 2ml N,N-Dimethyl-p-toluidin  
bei + 4° C aufbewahrt*

Es wurden zwei Teile Lösung A und drei Teile Lösung B ineinander gegeben und ergaben das Ausgießgemisch der Präparate. Die Mäuseschädelknochen härteten mit dem Ausgießgemisch im Glasröhrchen über Nacht im Kühlschrank aus.

### *3. Tag - Herstellung und Schneiden der Präparate*

Der Block wurde zum Schneiden vorbereitet, und das Glasröhrchen wurde entfernt. Der Kunststoffblock wurde dreieckig zugesägt und scharfe Kanten gefeilt.

Der Kunststoffblock wurde am Rotationsmikrotom mit der zugesägten Spitze nach oben eingespannt. Zum Schneiden am Rotationsmikrotom mittels D-Messer wurde eine Einstellung von 4µm vorgenommen und während des Schneidevorgangs das Messer und der Block mit 30% Alkohol (Schneideflüssigkeit) befeuchtet.

Jeder angefertigte Schnitt enthält nun Frontalschnitte aller 4 zuvor angefertigten Streifen der Schädelkalotte einer Maus.

### *Objektträgerbeschichtung*

Es wurden Giemsa- und Goldner- Färbungen durchgeführt. Hierfür wurden die Objektträger folgendermaßen beschichtet:

190ml Aceton reinst + 10ml 3-Triethoxysilyl-propylamin für 1 Minute

2 x 5 Minuten Aceton (Diagonal) gespült und über Nacht bei 37° C im Brutschrank getrocknet.

Für die durchgeführten Taträat-resistenten-saure-Phosphatase (TRAP) - Färbungen wurden

speziell beschichtete Objektträger Histo Bond ® (Firma Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) verwendet.

#### *Aufziehen der Schnitte auf beschichteten Objektträger*

Die 4µm Schnitte des Schädelknochens wurden auf die beschichteten Objektträger gezogen und mittels einer Lösung aus 80ml 70% Alkohol + 15ml Methylethylacetat gestreckt.

Die gestreckten Schnitte wurden mit Polyethylenfolie abgedeckt und angedrückt, in eine Presse eingespannt und über Nacht bei 37° C im Brutschrank getrocknet.

#### *4. Tag – Vorbereiten zum Färben*

Die Schnitte wurden aus der Presse entnommen, die Folien entfernt und entacryliert.

Danach wurden sie 1 x 15 Minuten in Toluol, dann 15 Minuten in Xylol, dann 1 x 5 Minuten in 99% Alkohol, danach 1 x 5 Minuten in 96% Alkohol und zum Abschluß 1 x 5 Minuten in Aqua dest. gespült.

Diese Schnitte wurden mit Giemsa, von Goldner oder Tartrat-resistenter-saurer-Phosphatase (TRAP) gefärbt.

## **2.7 Färben der Präparate**

### *Giemsa Färbung*

Entacrylierte Schnitte wurden 45 – 60 Minuten in der Giemsalösung (60ml Aqua dest. + 15ml Giemsa) inkubiert. Es folgte eine Differenzierung in 96% Isopropylalkohol. Der gefärbte Schnitt wurde mit Isopropylalkohol und Xylol gespült und dann in Eukitt ® eingebettet.

### *Goldner Färbung*

Entacrylierte Schnitte wurden 60 Minuten in Eisenhämatoxylin nach Weigert inkubiert, im Anschluß 10 Minuten mit Leitungswasser abgespült und weitere 30 Minuten mit Ponceau de Xylidine behandelt.

Anschließend wurde folgendes Procedere durchlaufen:

1% Essigsäure,

mit Aqua dest gespült,  
15 Minuten Färben mit Lichtgrün,  
1% Essigsäure,  
mit Aqua dest. gespült,  
Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol und schließlich in Eukitt ® eingebettet.

### TRAP – Färbung

Die Schnitte wurden in je 2 x 15 Minuten Toluol; 2 x 15 Minuten Xylol; 2 x 15 Minuten Aceton und Aqua dest. entacryliert.

### *Kochen in Citratpuffer*

Herstellung des Kochpuffers:

2,1g Zitronensäuremonohydrat (Merck Nr. 244) in 1Liter Aqua dest. lösen;  
mit ca. 10ml Natriumhydroxid auf pH 6,0 einstellen

Der Topf wurde mit genügend Volumen aufgefüllt, sodass die Schnitte während der Kochprozedur bedeckt blieben. Die Schnitte wurden im kalten Puffer erhitzt, der Kochpuffer wurde bei geöffnetem Deckel erwärmt und 1-2 Minuten kochen gelassen. Im Anschluss wurden die Schnitte ca. 20 Minuten abgekühlt und im Anschluss aus dem Kochpuffer entnommen und in Spülpuffer transferiert.

### *Immunhistochemische Färbung*

Die Schnitte wurden 60 Minuten mit dem Antikörper gegen Taträt-resistente-saure-Phosphatase (Clone 26 E5, Ig Class IgG2b AK Verdünnung 1:100, Novo Castra Laboratories Ltd., United Kingdom) inkubiert. Dann wurden die inkubierten Schnitte mit Phosphatpuffer (OptiMax Wash buffer HK583-5K 500ml - 8,5g NaCl + 1,43g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,25g KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ad 1000ml Aqua dest. Bio Genex, USA) abgespült.

Folgendes Procedere folgte im Anschluss:

30 Minuten Link (= Biotinyliertes Ziege/ Anti/ Maus bzw. Ziege/ Anti/ Kaninchen Immunglobulin);  
Spülen mit Phosphatpuffer (PBS = phosphat buffered saline),  
30 Minuten Label (Streptavidin Alkalische Phosphatase),  
Spülen mit Phosphatpuffer,  
10 Minuten Link wiederholen,

Spülen mit Phosphatpuffer,  
10 Minuten Link wiederholen,  
Spülen mit Phosphatpuffer,  
10 Minuten Färben mit Substrat Fast Red,  
Aqua dest.,  
30 Sekunden Hämalan,  
5 Minuten Leitungswasser,  
aufsteigende Alkoholreihe,  
Xylol.

Die Schnitte wurden mit Eukitt® eingedeckt.

## **2.8 Auswertung**

### **2.8.1 Bildanalyzesystem**

Die nach Giemsa, von Goldner und TRAP gefärbten Präparate wurden unter einem Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) mittels einer Digitalkamera (Coolpix 995, Nikon, Düsseldorf, Germany) fotografiert und die digitalen Fotos auf einem Computer gespeichert. Die histomorphometrische Analyse der Knochenschnitte erfolgte mit Hilfe eines computergestützten Bildanalyzesystems, Image Tool, Version 3.0 (University of Texas Health Science Center Saint Antonio (UTHSCSA), San Antonio, USA). Mit einer ebenfalls fotografierten Eichskala konnte das Computerprogramm geeicht und anschließend die benötigten Parameter ausgemessen werden.

### **2.8.2 Qualitative Beschreibung der histologischen Präparate**

Die Präparate wurden lichtmikroskopisch bei 40- und 100-facher Vergrößerung fotografiert und am Computerbildschirm beurteilt. Dabei wurde der erste optische Eindruck der einzelnen Präparate festgehalten, das Verhältnis zwischen mineralisiertem und nicht mineralisiertem Gewebe, die Ausprägung der Mittelliniensuturfläche, die Struktur des Präparates sowie die vorhandenen Zelltypen.



### 2.8.3 Quantitative Beschreibung der histologischen Präparate

Auf jeweils einem Objektträger der histologischen Präparate befinden sich 4 Frontalschnitte desselben Mausschädels. Alle im Folgenden beschriebenen Parameter zur histomorphometrischen Auswertung des Schädelknochens wurden in allen 4 Frontalschnitten eines Mausschädels ausgewertet und für das entsprechende Tier gemittelt.

#### Mittelliniensuturfläche

Die Mittelliniensutur ist die bindegewebige Verbindung der beiden Parietalknochen. Die Fläche der Mittelliniensutur gilt in unserem Versuch als Indikator für die Knochenresorption und wurde bei 40-facher Vergrößerung in den von Goldner gefärbten Präparaten gemessen. Wenn durch die Resorption des Knochens eine Verbindung zwischen der Mittelliniensutur und Markräumen entstanden ist, so wurden diese Markraumflächen als Anteil der Mittelliniensutur betrachtet und mit dieser gemeinsam gemessen.



Abbildung 3: Gruppe 1, abgebildete Skala: 1mm, 66fache Vergrößerung, dunkel gefärbt: die Mittelliniensuturfläche

Osteoklastenzahl

Zur Auszählung der Osteoklasten wurden die mit TRAP gefärbten Knochenschnitte verwendet. Gezählt wurden TRAP-positive Zellen, also rot angefärbte Zellen, die in einer Osteolyse oder an der Markraum-Knochen-Grenze lagen. Die Mehrkernigkeit wurde nicht als Voraussetzung gewählt, da bei der Anfertigung eines Schnittes nicht zwangsläufig mehrere Kerne angeschnitten sein müssen. Die Auszählung erfolgte in 100-facher Vergrößerung. Die Angabe der Osteoklastenzahl gilt für den gesamten Schnitt.

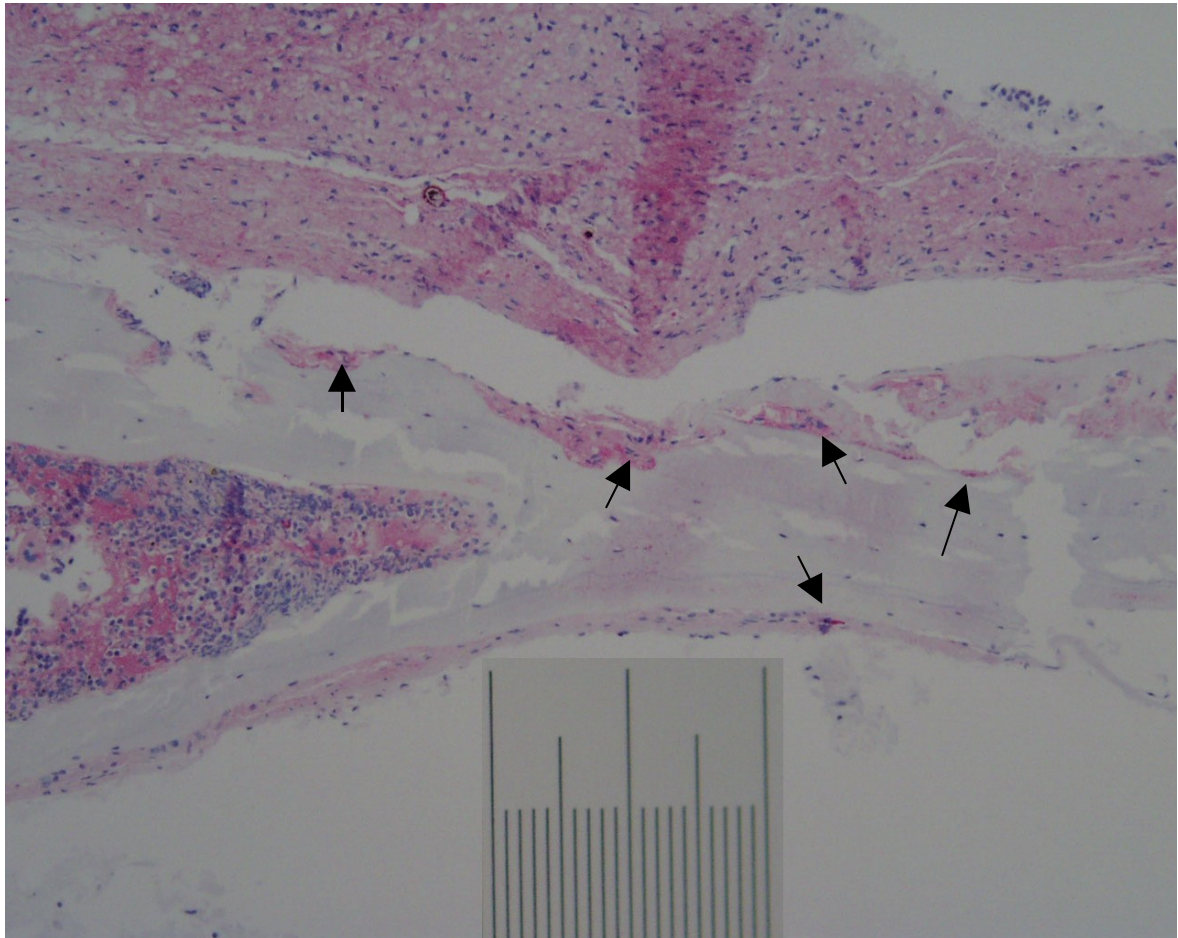


Abbildung 4: Gruppe 3, 180fache Vergrößerung, TRAP-Färbung, abgebildete Skalierung entspricht 0,2mm, die Pfeile markieren Beispiele für TRAP-positive Zellen

### Gewebeverteilung in Prozent

Bei der prozentualen Gewebeverteilung wurde die Fläche der verschiedenen in den Schnitten auftretenden Gewebearten in Beziehung zur Gesamtfläche des Präparates gesetzt. Dazu wurde zunächst die Gesamtfläche des Präparates in 4-facher Vergrößerung ausgemessen, und deren Wert gleich 100% gesetzt.

Anteile an der Gesamtfläche bildeten das Gesamtknochengewebe - das sich aus Osteoid und mineralisiertem Knochen zusammensetzt - die Markraumflächen, die Mittelliniensuturfläche sowie die Osteolysen.

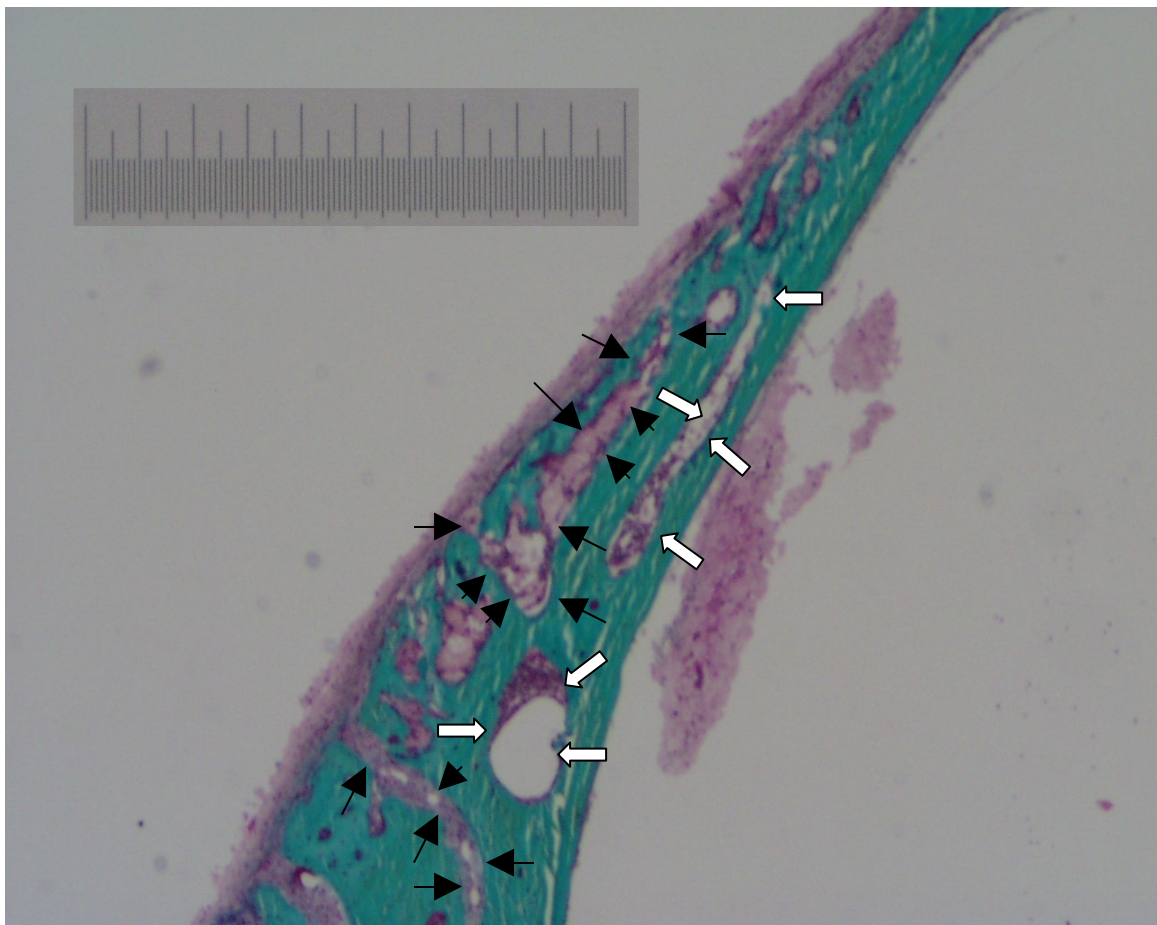


Abbildung 5: Gruppe 2, Goldner-Färbung, 71fache Vergrößerung, abgebildete Skala entspricht 1mm, die dünnen Pfeile markieren die Osteolysen, Markräume werden beispielhaft von Blockpfeilen gekennzeichnet.

### Gesamtes Knochengewebe

Zum gesamten Knochengewebe zählt die Fläche des mineralisierten Knochens und des Osteoids.

### Osteoid/ Knochenneubildung

Das Osteoid ist die Fläche des neu gebildeten noch nicht mineralisierten Knochens. Das



Osteoid wurde nach morphologischen Kriterien bestimmt. Es wurde keine Spezialfärbung angefertigt um das Osteoid zu kennzeichnen. Es wurde an Giemsa-gefärbten Schnitten identifiziert. Die Flächenmessung erfolgte zur Bestimmung der Gewebeverteilung an Goldner-gefärbten Schnitten.

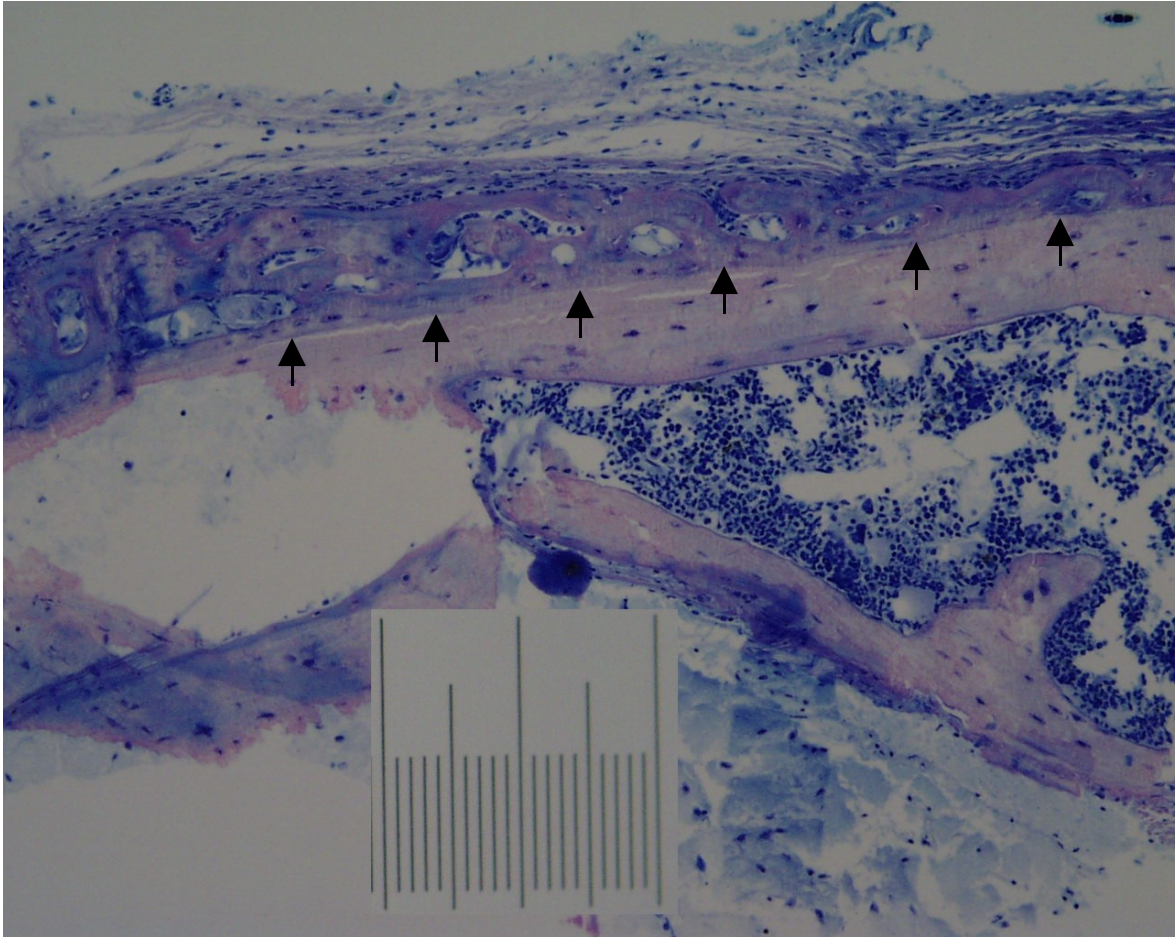


Abbildung 6: Gruppe 3, 180fache Vergrößerung, Skalierung entspricht 0,2mm, die Pfeile zeigen die Grenze zwischen Knochen und darüberliegender Knochenneubildung (rein morphologische Abgrenzung)

### Kortikale Dicke

Die kortikale Dicke beschreibt die Dicke des Knochens zwischen äußerem und innerem Periost der Schädeldecke. Zur Messung der kortikalen Dicken wurde ein Maßstabgitter über die Giemsa-gefärbten Schnitte gelegt, dessen Nullpunkt genau im Zentrum der Mittelliniensutur lag. Von diesem Nullpunkt wurden in Abständen von 0,5mm nach rechts (0,5; 1; 1,5; 2) und links (-0,5; -1; -1,5; -2) jeweils 4mal die Dicke des Knochens gemessen. Die Messwerte wurden für die einzelnen Messpunkte gruppenweise gemittelt und anschließend wurden diese Werte der einzelnen Messpunkte für die durchschnittliche Präparatdicke gemittelt.

## **2.9 Statistik**

Die histomorphometrisch erhobenen Daten wurden zur weiteren Analyse in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel XP (Firma Microsoft, New York, USA) eingegeben. Zur Beschreibung der ermittelten Parameter wurde für jede oben genannte Untersuchungsgruppe der Mittelwert sowie die Standardabweichung angegeben.

Beim Vorliegen signifikanter Verteilungsunterschiede getestet mit one-way ANOVA (analysis of variance between groups) wurde ein Gruppenvergleich zwischen den Untersuchungsgruppen mit dem Student-t-Test vorgenommen und das Signifikanzniveau ermittelt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Qualitative histologische Analyse der Knochenschnitte

In der Übersichtsvergrößerung stellt sich der Querschnitt durch den Mausschädel wie folgt dar:

Man erkennt einen gebogenen Streifen Knochengewebe, der in zwei Hälften geteilt ist und von Bindegewebe, der Mittelliniensutur verbunden wird. Der Knochen ist dreischichtig aufgebaut in eine Außenkortikalis, gefolgt von einer spongiösen Schicht, der Diploë, und der Innenkortikalis. Sowohl die Außen- als auch die Innenkortikalis sind von Knochenhaut, dem Periost und Endost überzogen. In der spongiösen Schicht befinden sich Markräume mit Blutgefäßen. Darin enthalten erkennt man sowohl Zellen der roten als auch der weißen Blutreihe. Der Knochen enthält Osteozyten, die von solider mineralisierter Knochenmatrix umgeben sind.

Dem Knochen aufgelagert ist eine bindegewebige Schicht, die als Operationsnarbe zu interpretieren ist.

#### Gruppe I





Abbildung 7: Gruppe 1, Goldner-Färbung, 66fache Vergrößerung, abgebildete Skala entspricht 1mm

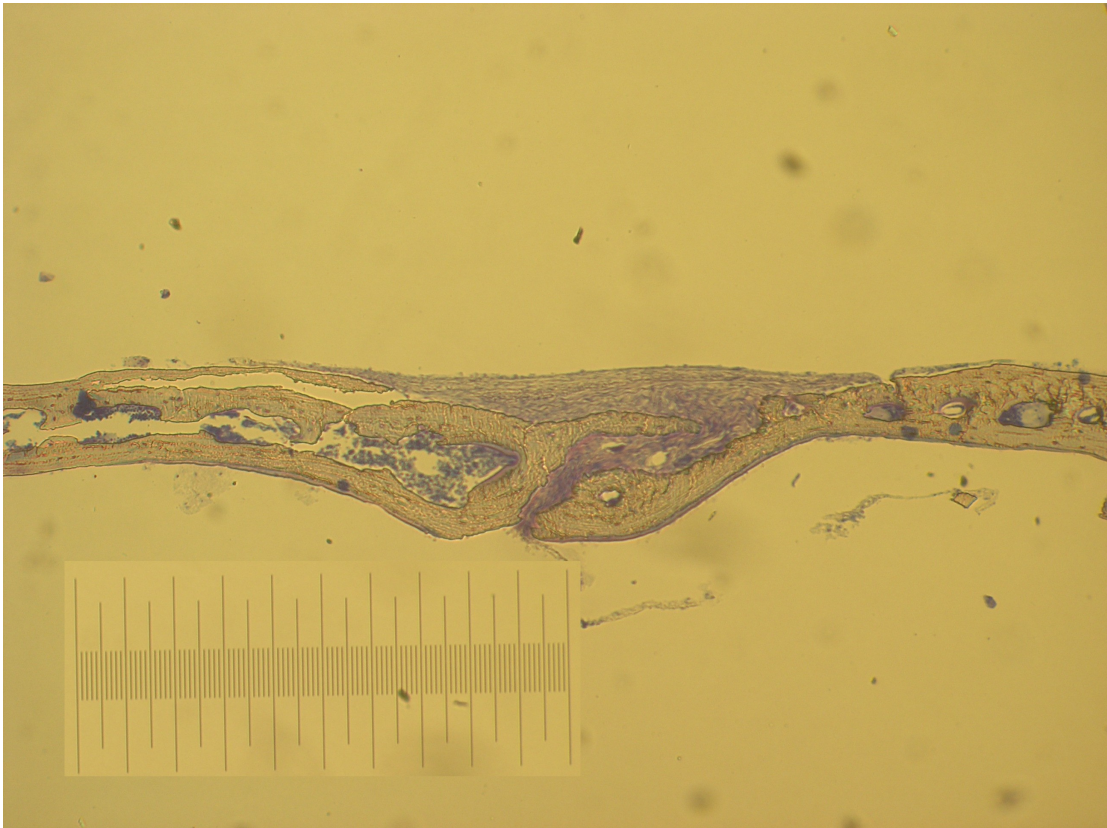


Abbildung 8: Gruppe 1, Giemsa-Färbung, 66fache Vergrößerung, abgebildete Skala entspricht 1mm

Der Knochen stellt sich glatt konturiert dar. Er wird von einem intakten Periost überzogen. Osteolysen beidseits der Mittelliniensutur treten nur in geringem Maße auf. Die Mikrostruktur des Knochens ist regelmäßig. Osteozyten sind in allen Präparaten nachweisbar. Multinukleäre Zellen sowie TRAP-positive Zellen werden nur vereinzelt aufgefunden. Die Mittelliniensutur ist nur in vereinzelt Präparaten vergrößert und mit einem zellarmen kollagenreichen Bindegewebe ausgefüllt. Ein Narbengewebe als Folge der vorausgegangenen Operation ist nur spärlich ausgebildet.

Gruppe II

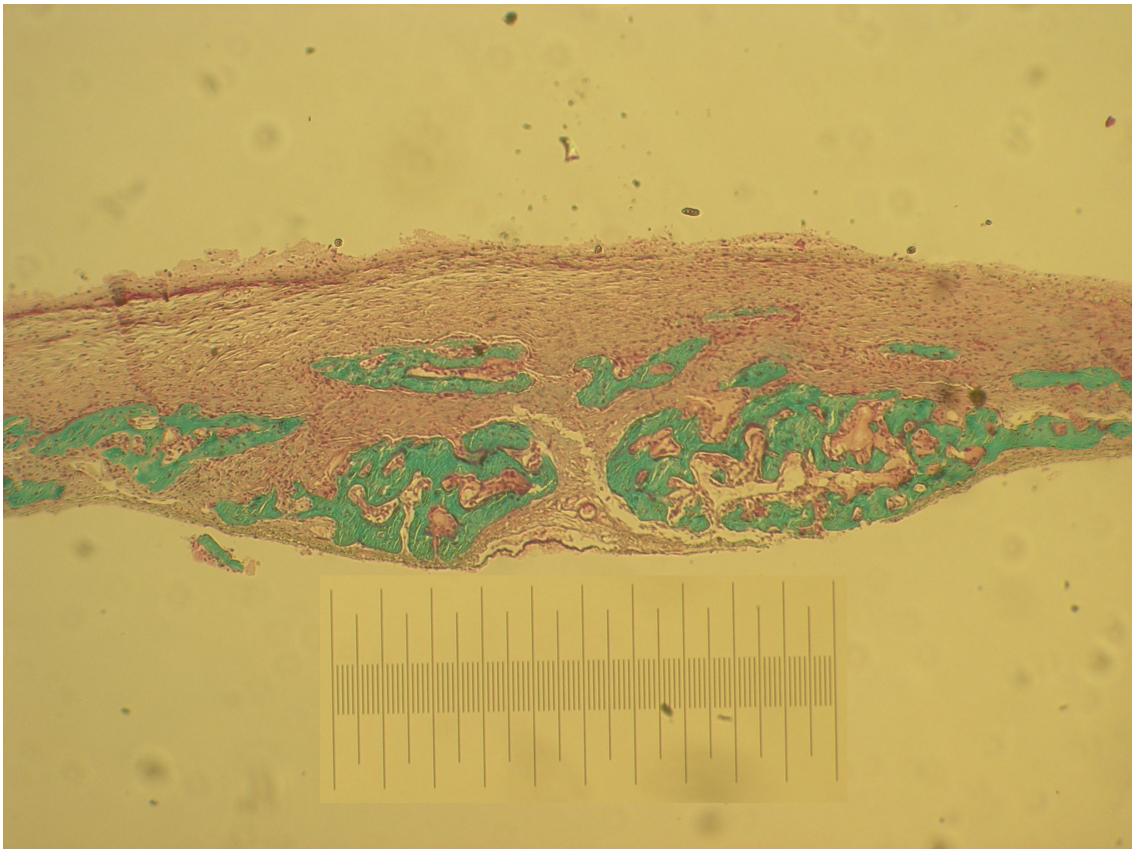


Abbildung 9: Gruppe 2, Goldner-Färbung, 66fache Vergrößerung, abgebildete Skala entspricht 1mm

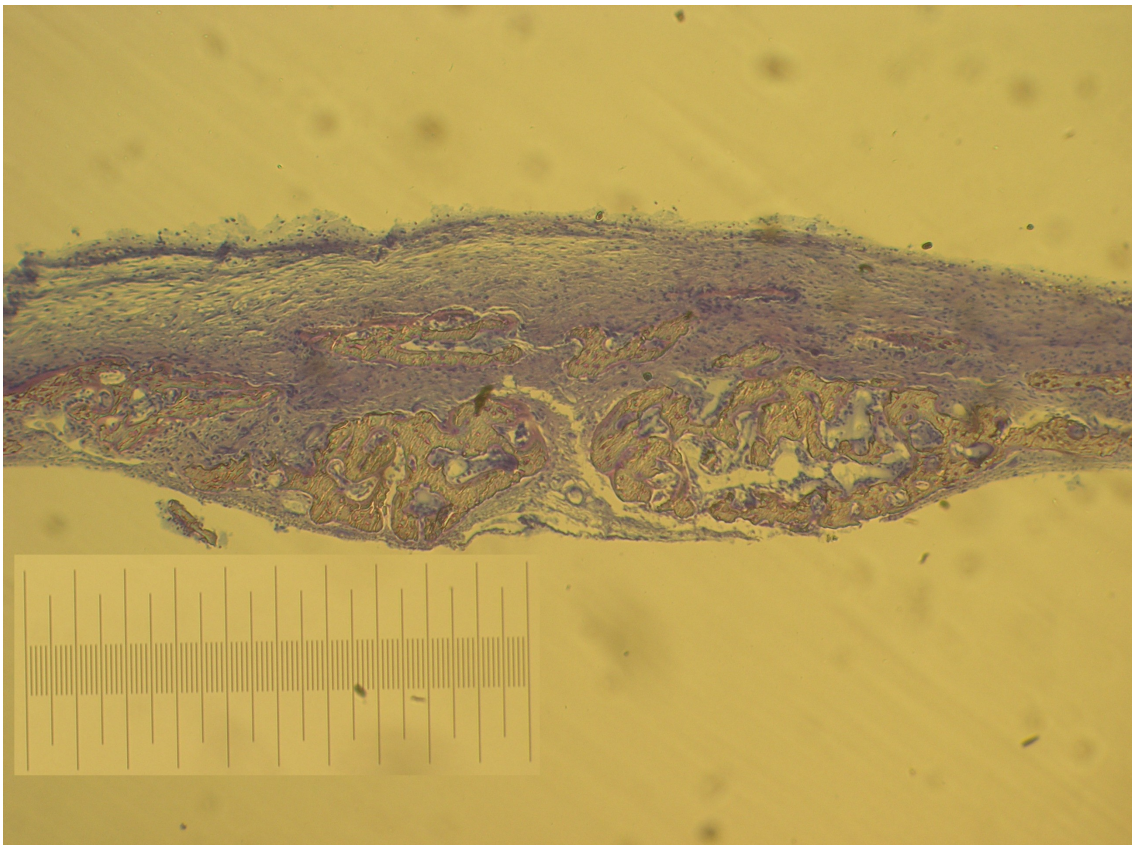




Abbildung 10: Gruppe 2, Giemsa-Färbung, 66fache Vergrößerung, abgebildete Skala entspricht 1mm

Hier zeigt sich ein unruhiges Bild mit deutlich ausgeprägtem Narbengewebe, das entzündlich infiltriert ist. Es findet sich eine stark aufgelockerte Knochenstruktur mit großen Osteolysen auf beiden Seiten der Mittelliniensutur. Das Periost ist nicht mehr intakt. Die Mittelliniensutur zeigt einen deutlichen Substanzverlust im Vergleich zu Gruppe I, III, IV und V. Teilweise ist sie mit den ebenfalls deutlich vergrößerten Markräumen fusioniert. In einigen Präparaten ist der Knochen mehrfach perforiert. Es existiert keine durchgängige Knochenplatte mehr. In den Resorptionslakunen sind multinukleäre Zellen zu finden, ebenfalls reihen sich Entzündungszellen (Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen) um diese Osteolysezonen pallisadenartig auf. Die mit TRAP immunhistochemisch angefärbten Schnitte weisen im Vergleich zu Gruppe I, III, IV und V eine wesentlich höhere Anzahl an TRAP-positiven Zellen auf.

#### Gruppe III und IV

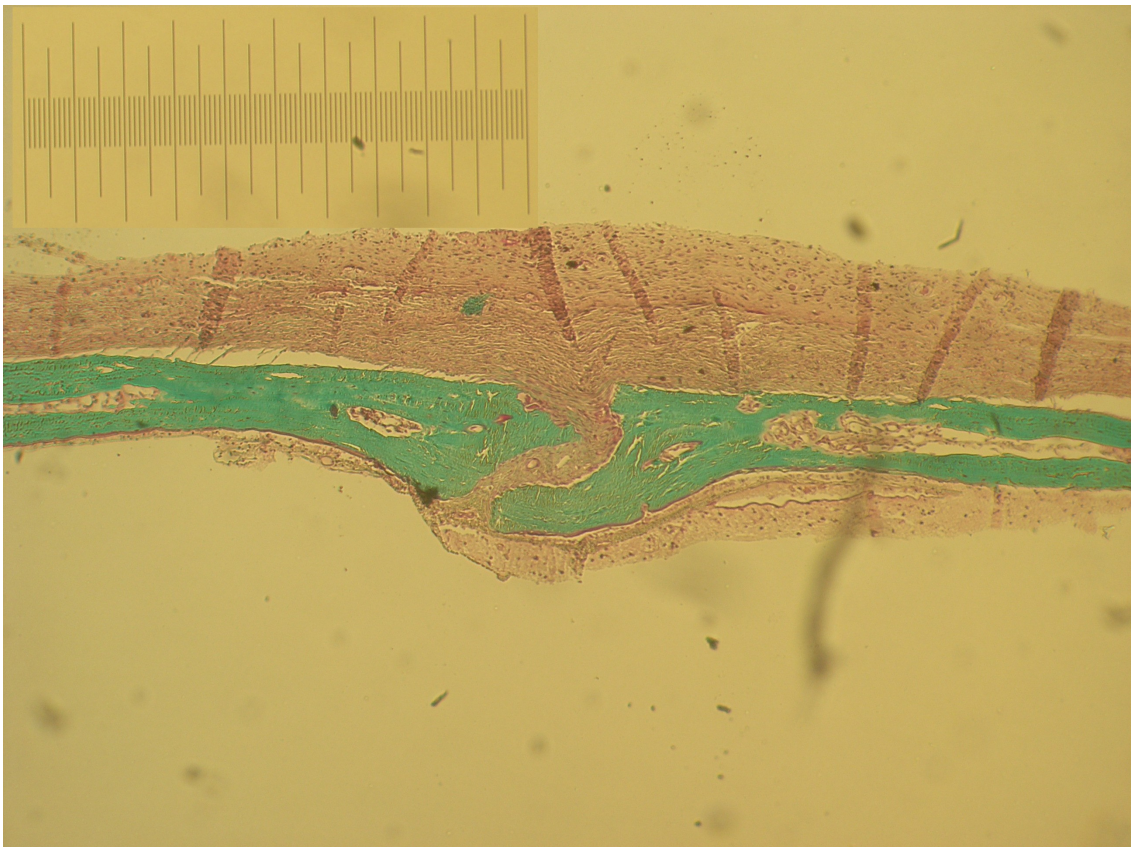


Abbildung 11: Gruppe 3, Goldner-Färbung, 66fache Vergrößerung, abgebildete Skala entspricht 1mm

Im Vergleich zu Gruppe II erscheint das Präparat morphologisch solide und strukturierter.

Der Knochen weist weniger osteolytische Zonen auf, und die Mittelliniensutur ist deutlich kleiner gemessen an Gruppe II. In einigen Präparaten findet sich osteoides Gewebe. Dieses Gewebe ist zu beiden Seiten der Mittelliniensutur zu finden und dem soliden Knochen aufgelagert. In diesem osteoiden Gewebe lassen sich Osteozyten, Osteoblasten und Kapillarendothelzellen als Hinweis auf neu gebildete Gefäße mit darin enthaltenen Erythrozyten finden. Die Markräume zeigen überwiegend keine Verbindung zur Mittelliniensutur bzw. zum Periost und Endost. Der Knochen zeigt sich als kompakte Struktur und ist außerhalb der Mittelliniensutur nicht unterbrochen. Dem Knochen aufgelagert ist eine weitgehend intakte Periostschicht, darüber findet sich eine deutliche zellarme Narbenbildung. Zwischen Gruppe III und IV lassen sich qualitativ keine wesentlichen Unterschiede ausmachen.

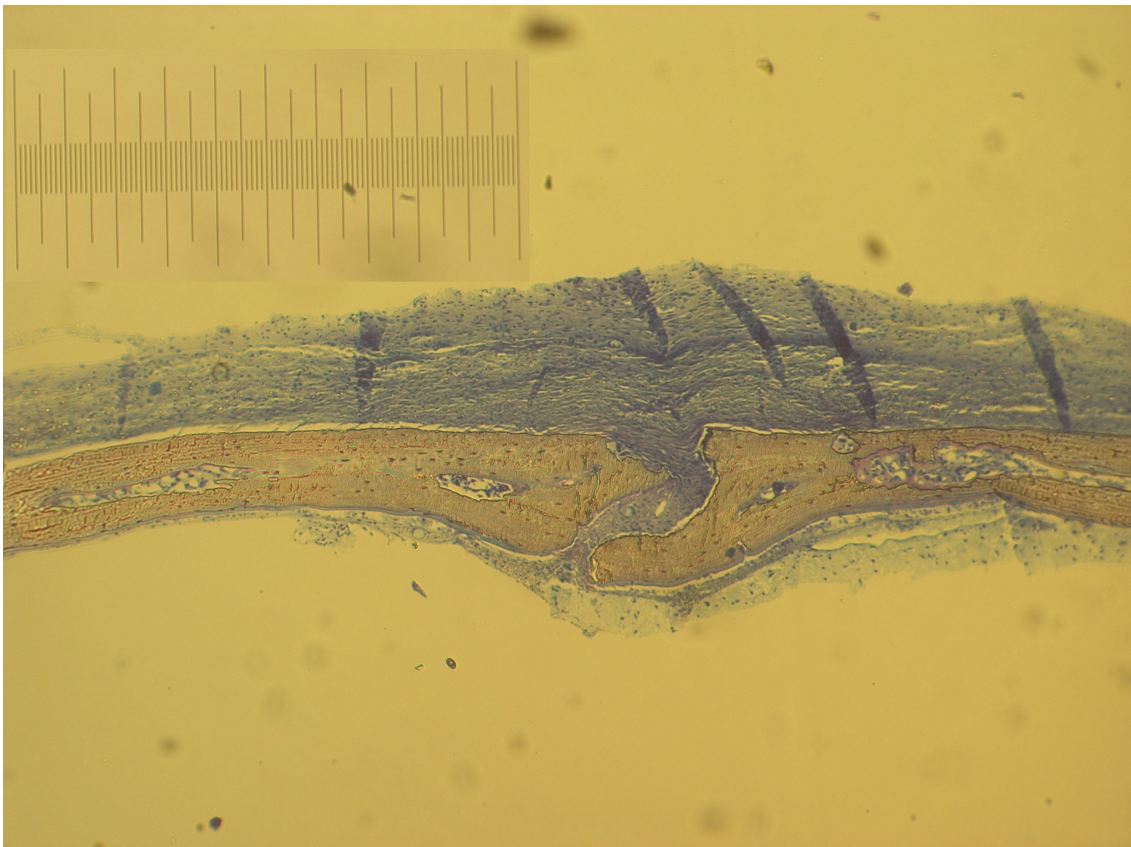


Abbildung 12: Gruppe 3, Giemsa-Färbung, 66fache Vergrößerung, abgebildete Skala entspricht 1mm



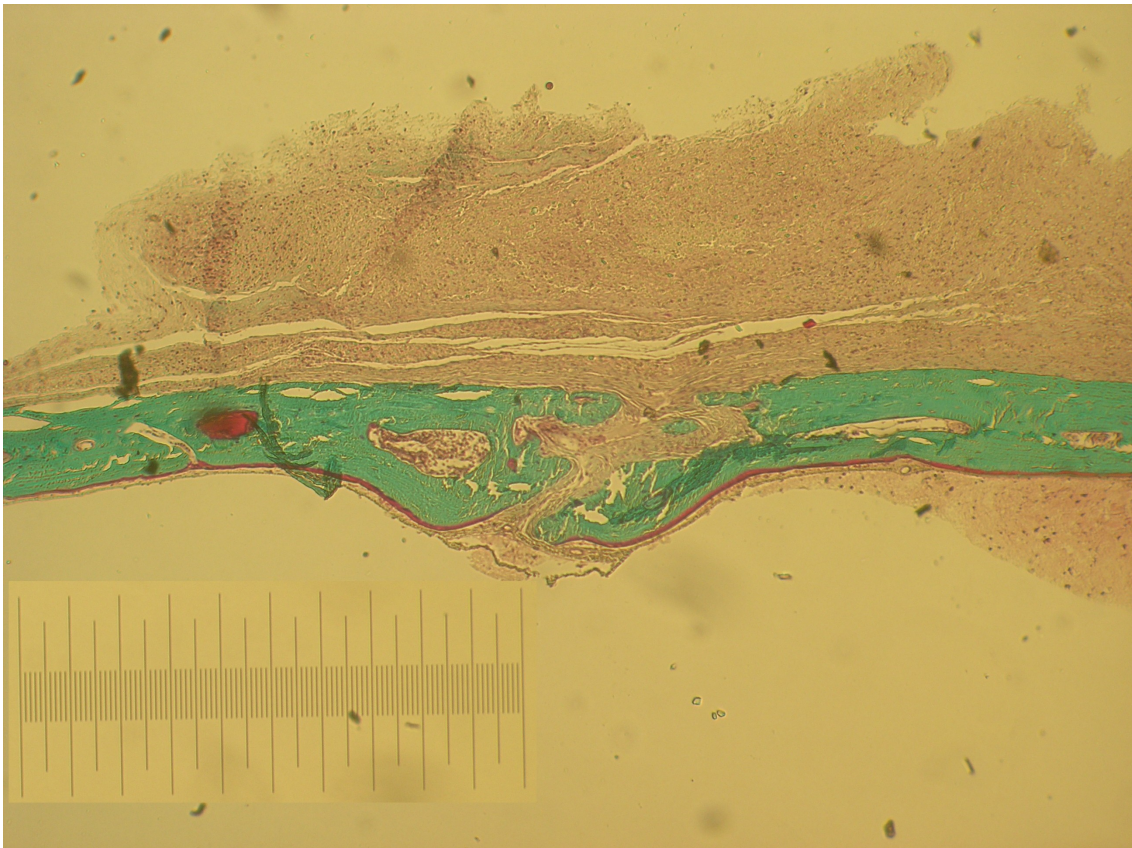


Abbildung 13: Gruppe 4, Goldner-Färbung, 66fache Vergrößerung, abgebildete Skala entspricht 1mm

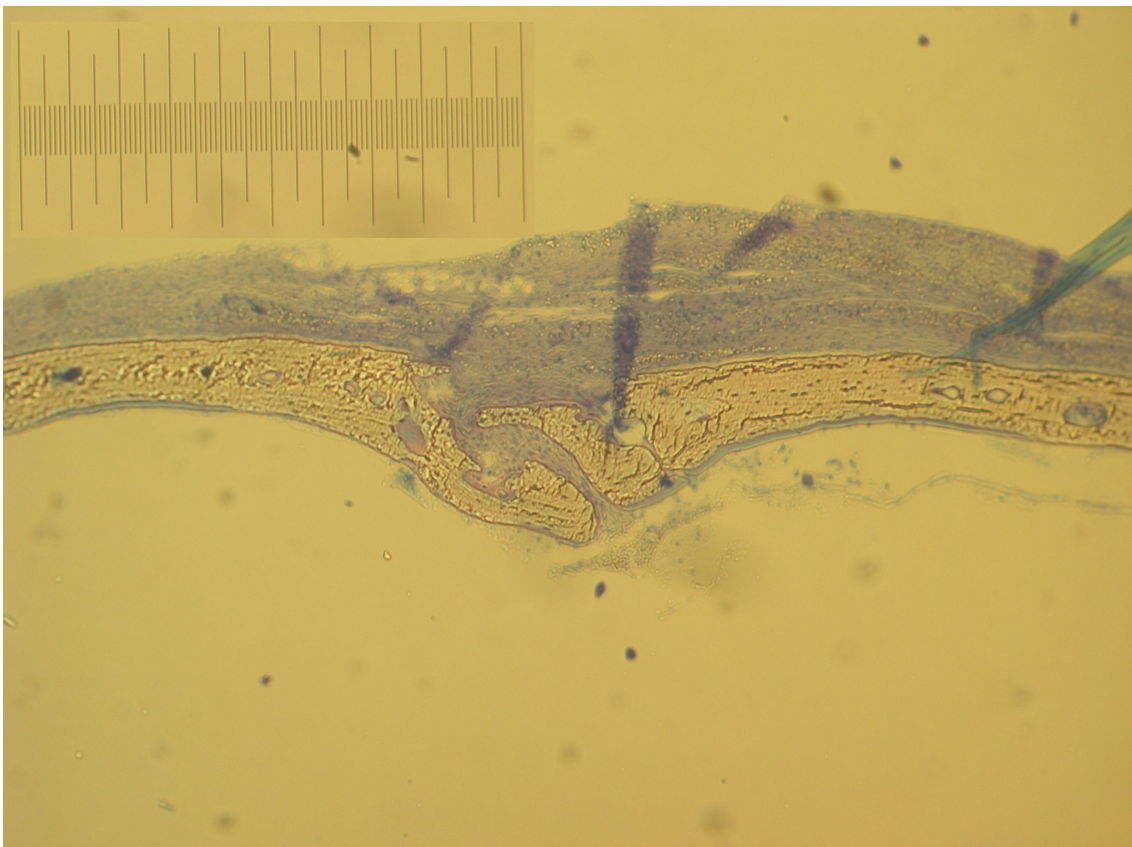


Abbildung 14: Gruppe 4, Giemsa-Färbung, 66fache Vergrößerung, , abgebildete Skala entspricht 1mm

## Gruppe V

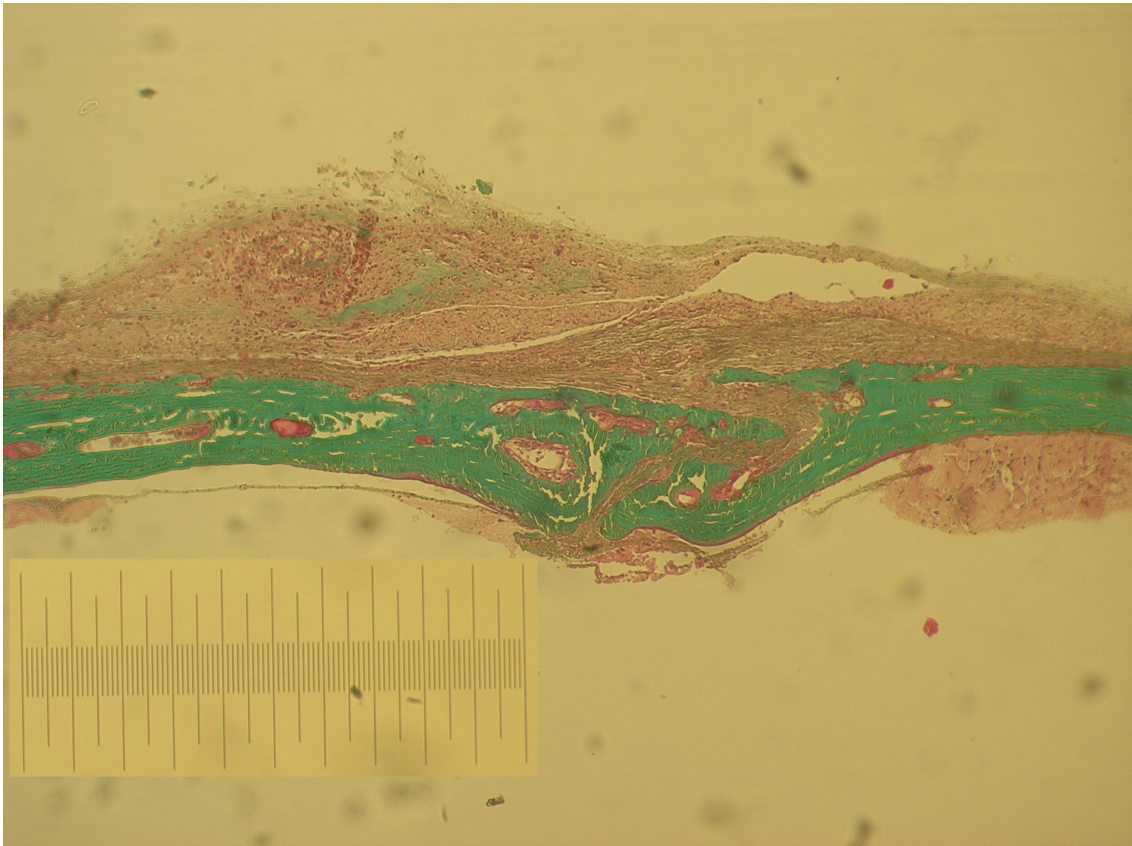


Abbildung 15: Gruppe 5, Goldner-Färbung, 66fache Vergrößerung, abgebildete Skala entspricht 1mm

Die Morphologie des Knochens in Gruppe V ist ähnlich der der Gruppe III und IV. Im Vergleich zu diesen beiden Gruppen scheint in Gruppe V beim Betrachten mehr osteoides Gewebe vorhanden zu sein. Sowohl die Größe der Mittelliniensutur als auch die Osteoklastenzahl weichen unwesentlich von Gruppe III und IV ab.



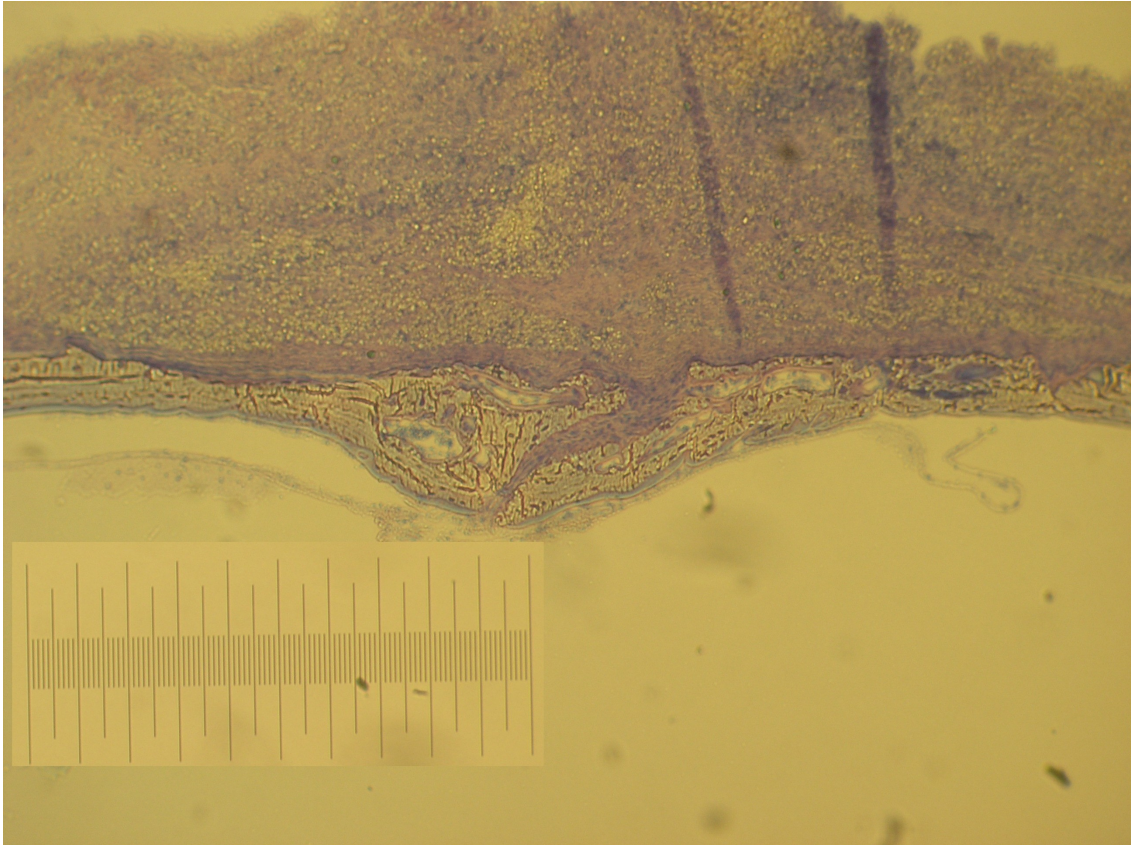
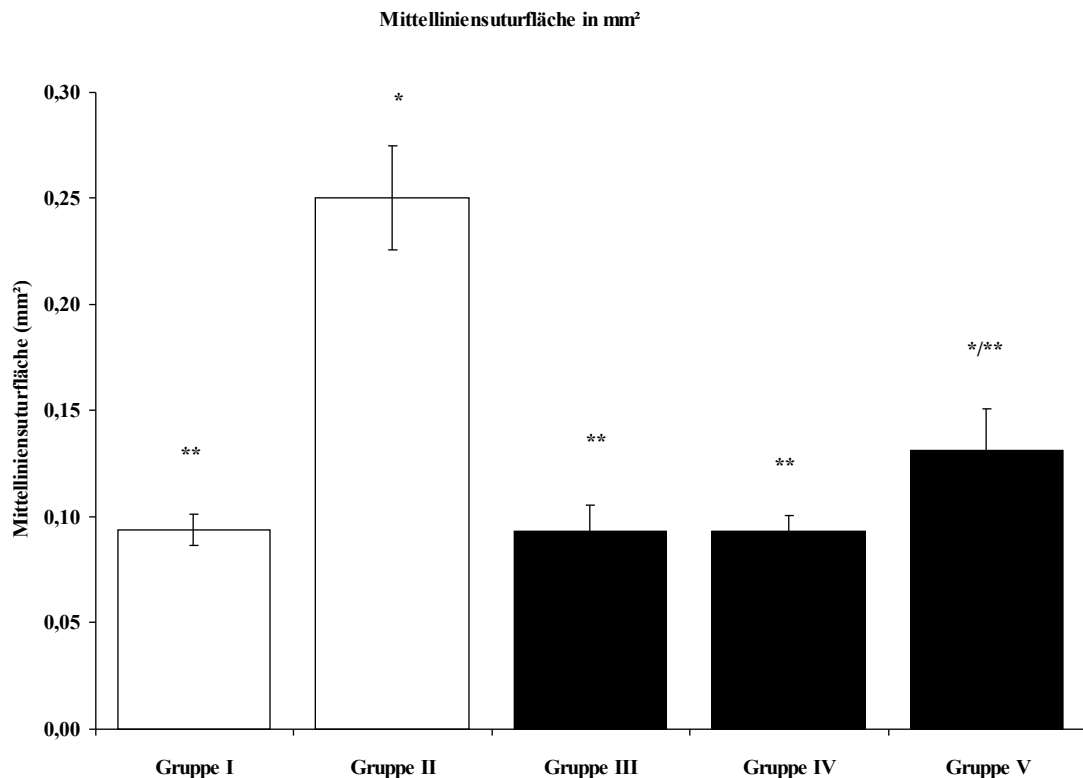


Abbildung 16: Gruppe 5, Giemsa-Färbung, 66fache Vergrößerung, abgebildete Skala entspricht 1mm

### 3.2 Quantitative histologische Analyse der Knochenschnitte

#### 3.2.1 Mittelliniensuturfläche

In Gruppe I (ohne Partikelimplantation) betrug die Mittelliniensuturfläche  $0,09 \pm 0,007\text{mm}^2$  (Minimum  $0,01\text{mm}^2$ , Maximum  $0,13\text{mm}^2$ ) im Vergleich zu  $0,25 \pm 0,02\text{mm}^2$  (Minimum  $0,14\text{mm}^2$ , Maximum  $0,34\text{mm}^2$ ) in Gruppe II (mit Partikelimplantation). Für Gruppe III, die neben Polyethylenpartikeln auch täglich Fc-OPG - beginnend am OP-Tag – erhielt, wurde eine Mittelliniensuturfläche von  $0,09 \pm 0,01\text{mm}^2$  (Minimum  $0,06\text{mm}^2$ , Maximum  $0,15\text{mm}^2$ ) gemessen, die sich von der in Gruppe IV (Partikelimplantation und Fc-OPG ab dem 5. postoperativen Tag) mit  $0,09 \pm 0,008\text{mm}^2$  (Minimum  $0,05\text{mm}^2$ , Maximum  $0,11\text{mm}^2$ ) nicht wesentlich unterschied.



**Diagramm 1:** Mittelliniensuturfäche in mm<sup>2</sup>

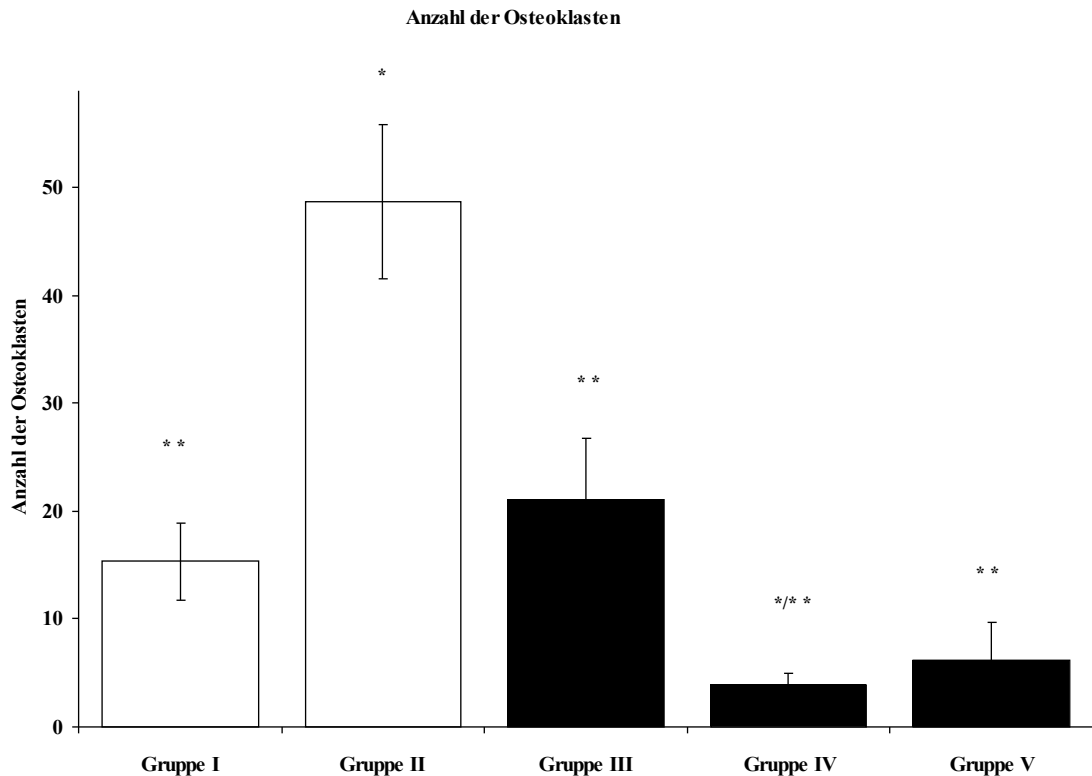
(Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \* =  $p < 0,05$  gegenüber Gruppe I; \*\* =  $p < 0,05$  gegenüber Gruppe II)

Die Mittelliniensuturfäche in Gruppe V betrug  $0,13 \pm 0,02 \text{ mm}^2$  (Minimum  $0,08 \text{ mm}^2$ , Maximum  $0,2 \text{ mm}^2$ ) (Diagramm 1).

Es konnte ein statistisch signifikanter Unterschied für die Mittelliniensuturfäche zwischen Gruppe I und II ( $p = 0,018$ ), zwischen Gruppe II und III ( $p = 0,0015$ ), zwischen Gruppe II und IV ( $p = 0,002$ ) sowie zwischen Gruppe II und V ( $p = 0,0014$ ) festgestellt werden.

### 3.2.2 Osteoklastenzahl

Für die Tiere der Gruppe I wurde eine Osteoklastenzahl von  $15,3 \pm 3,6$  (Minimum 5, Maximum 28) und für die Tiere der Gruppe II von  $48,7 \pm 7,1$  (Minimum 20, Maximum 75) bestimmt. Die Osteoklastenzahl betrug in Gruppe III  $21,1 \pm 5,6$  (Minimum 6, Maximum 45), in Gruppe IV  $3,9 \pm 1,0$  (Minimum 1, Maximum 8) und in Gruppe V  $6,2 \pm 3,1$  (Minimum 1, Maximum 21).



**Diagramm 2:** Anzahl der Osteoklasten pro Schnitt

(Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, \* =  $p < 0,05$  gegenüber Gruppe I; \*\* =  $p < 0,05$  gegenüber Gruppe II)

Die Osteoklastenzahlen unterschieden sich signifikant zwischen Gruppe I und II ( $p=0,0085$ ), zwischen Gruppe II und III ( $p=0,0098$ ), zwischen Gruppe II und IV ( $p=0,0011$ ) sowie zwischen Gruppe II und V ( $p=0,00022$ ).

### 3.2.3 Gewebeverteilung

Das Gesamtgewebe der Schnitte wurde folgendermaßen aufgeschlüsselt: Gesamtknochengewebe, Osteoid, Knochen minus Osteoid, Osteolysefläche, Markraum und Mittelliniensuturfläche.

In Gruppe I wurde ein Gesamtknochenanteil von 80,18% an der Gesamtpräparatfläche gemessen. Der Osteoidanteil betrug 0,49%, daraus ließ sich eine reine Knochenfläche (ohne Osteoid) von 79,29% errechnen. Die Mittelliniensuturfläche bildete einen Anteil von 4,79% an der Gesamtfläche. 1,48% der Fläche waren Osteolysen und 13,37% der Fläche nahm der Markraum ein.

In Gruppe II betrug die reine Knochenfläche 70,61%, die sich mit dem Osteoidanteil von 0,61% zu einem Gesamtknochengewebe von 71,42% addierte. Die Mittelliniensuturfläche bildete einen Anteil von 9,71%, die Osteolysefläche von 8,98% und die Markraumfläche

beanspruchte einen Anteil von 11,02% am Gesamtgewebe.

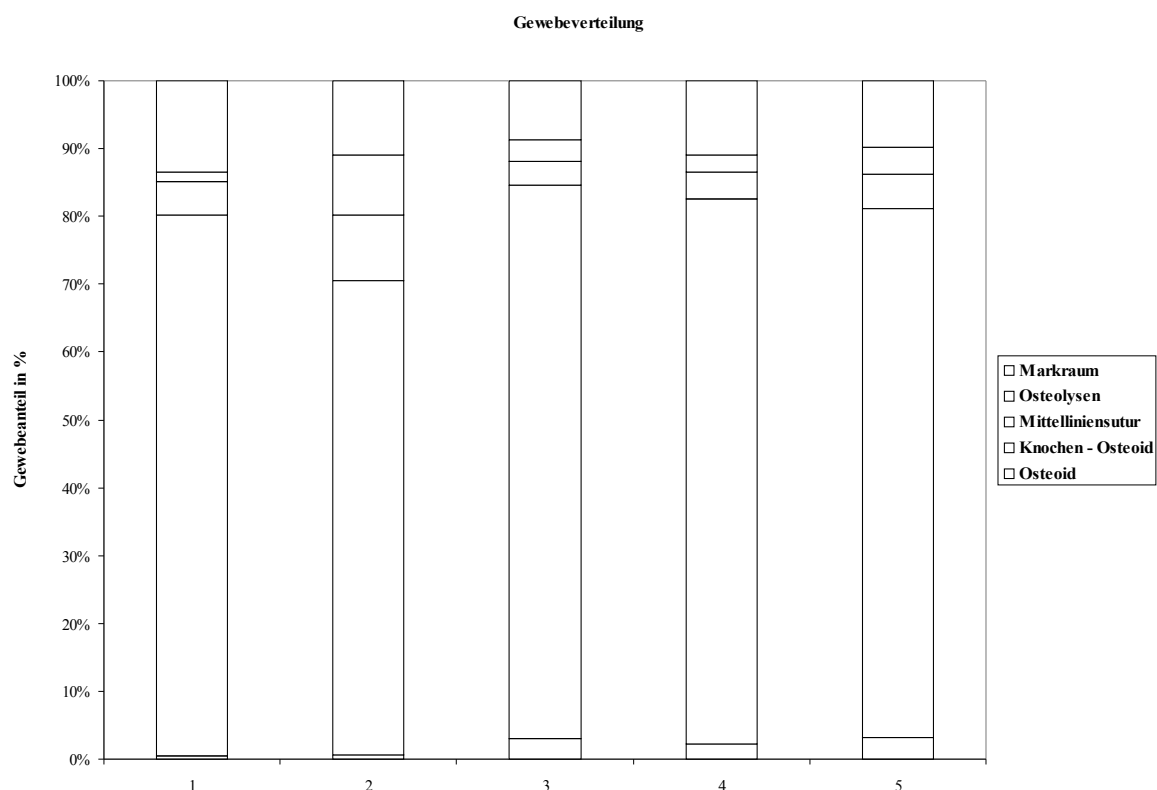
Für Gruppe III ergab die Summe von reiner Knochenfläche mit 82,44% und Osteoid mit 3,01% eine Gesamtknochenfläche von 84,73%. Dazu wurde der Anteil der Mittelliniensuturfläche von 3,44% bestimmt. Die Osteolysefläche machte 3,24% und die Markraumfläche 8,78% der Fläche aus.

Das Gesamtknochengewebe in Gruppe IV betrug 82,48%, aufgeschlüsselt in 80,4% reines Knochengewebe und 2,18% Osteoidanteil an der Gesamtgewebefläche. Die Mittelliniensuturfläche nahm einen Anteil von 3,93%, die Osteolysefläche von 2,62% und die Markraumfläche von 10,92% ein.

Mit 77,95% reiner Knochenfläche und 3,15% Osteoid wurde für Gruppe V ein Gesamtknochenflächenanteil von 81,5% bestimmt. Die Mittelliniensuturfläche machte 5,12% der Fläche aus, die Osteolyseflächen beanspruchten einen Anteil von 3,94% und die Markräume von 9,84%.

Zusammengefasst konnte ein deutlicher Knochensubstanzverlust von 8,68% von Gruppe II im Verhältnis zu Gruppe I festgestellt werden. Dieser Knochensubstanzverlust wurde in Gruppe III – V nicht nachgewiesen. Außerdem konnte für die Gruppen III – V ein deutlich erhöhter Knochenumsatz gezeigt werden: Der Anteil der Osteolysen war in Gruppe III – V zwar deutlich geringer als in Gruppe II, unterschied sich jedoch auch von den wesentlich geringer ausfallenden Osteolysen in Gruppe I. Ebenfalls konnte für die Gruppen III – V ein bis zu 2,5% höherer Anteil an Osteoid festgestellt werden. Der Anteil an Knochen – Osteoid unterschied sich signifikant zwischen Gruppe II und Gruppe III ( $p=0,004$ ) sowie zwischen Gruppe III und Gruppe IV ( $p=0,015$ ). Nicht signifikant unterschieden sich Gruppe I von Gruppe II ( $p=0,287$ ), Gruppe I von Gruppe III ( $p=0,058$ ), Gruppe I von Gruppe IV ( $p=0,151$ ) und Gruppe I von Gruppe V ( $p=0,078$ ). Ebenfalls nicht signifikant unterschied sich Gruppe II von IV ( $p=0,426$ ), Gruppe II von V ( $p=0,157$ ), Gruppe III von V ( $p=0,094$ ) und Gruppe IV von Gruppe V ( $p=0,111$ ).





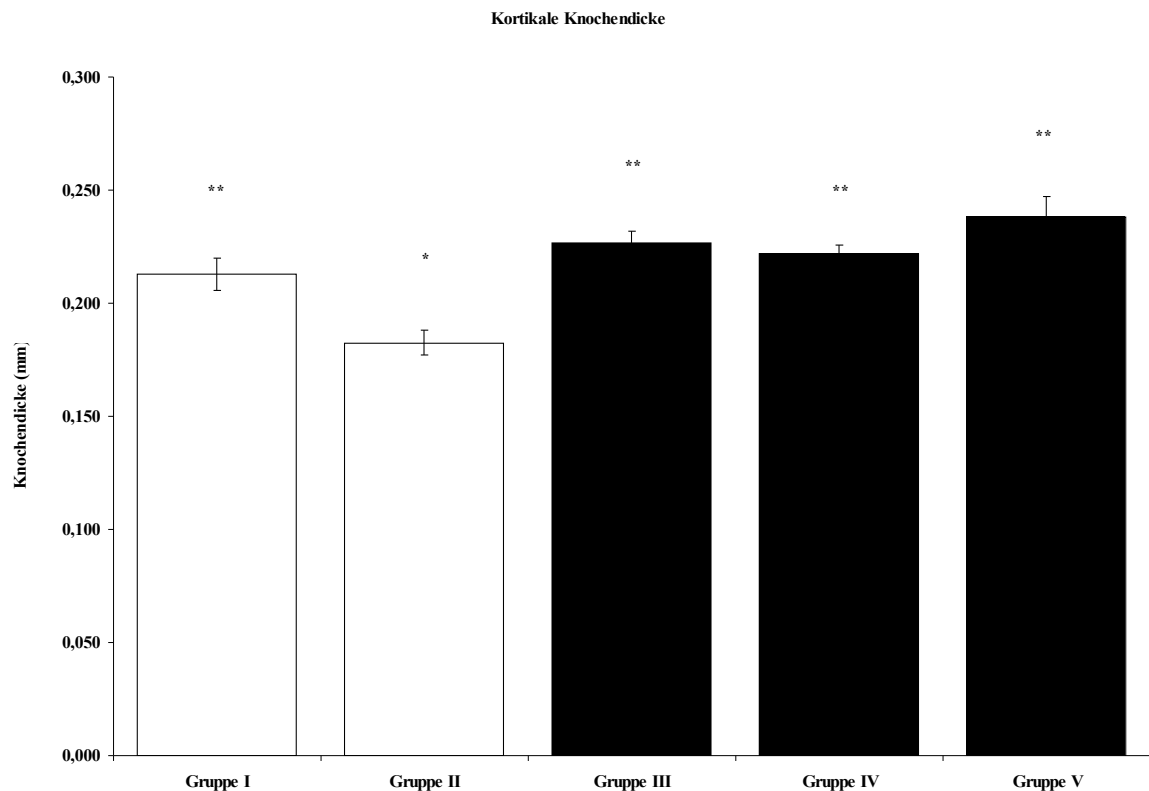
**Diagramm 3:** Gewebeverteilung in %

### 3.2.4 Kortikale Knochendicke

Das Bild der Knochendicke zeigte über alle Gruppen die größte Dicke an der Mittelliniensutur. Die Dicke nahm in Richtung zur parietalen Sutur im Verlauf ab um in der zweiten Hälfte bis zur Parietalsutur wieder zuzunehmen.

Die kortikale Knochendicke betrug in Gruppe I durchschnittlich  $0,21 \pm 0,007\text{cm}$ , die in Gruppe II lag mit  $0,18 \pm 0,005\text{cm}$  deutlich darunter. In der durchgehend mit OPG behandelten Gruppe III betrug die Knochendicke  $0,23 \pm 0,005\text{cm}$ , in der ab dem 5. Tag mit OPG behandelten Gruppe IV betrug sie  $0,22 \pm 0,004\text{cm}$ . In Gruppe V lag die Knochendicke mit  $0,24 \pm 0,009\text{cm}$  noch über der der anderen Gruppen.

Die kortikale Knochendicke unterschied sich signifikant zwischen Gruppe I und III ( $p=0,023$ ), zwischen Gruppe II und III ( $p=0,002$ ), zwischen Gruppe II und IV ( $p=0,002$ ) und zwischen Gruppe II und V ( $p=0,001$ ). Nicht signifikant verschieden war Gruppe I von II ( $p=0,09$ ), Gruppe I von IV ( $p=0,208$ ), Gruppe I von V ( $p=0,220$ ). Außerdem gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Gruppe III und IV ( $p=0,122$ ), zwischen Gruppe III und V ( $p=0,323$ ) und zwischen Gruppe IV und V ( $p=0,191$ ).



**Diagramm 4:** Kortikale Knochendicke

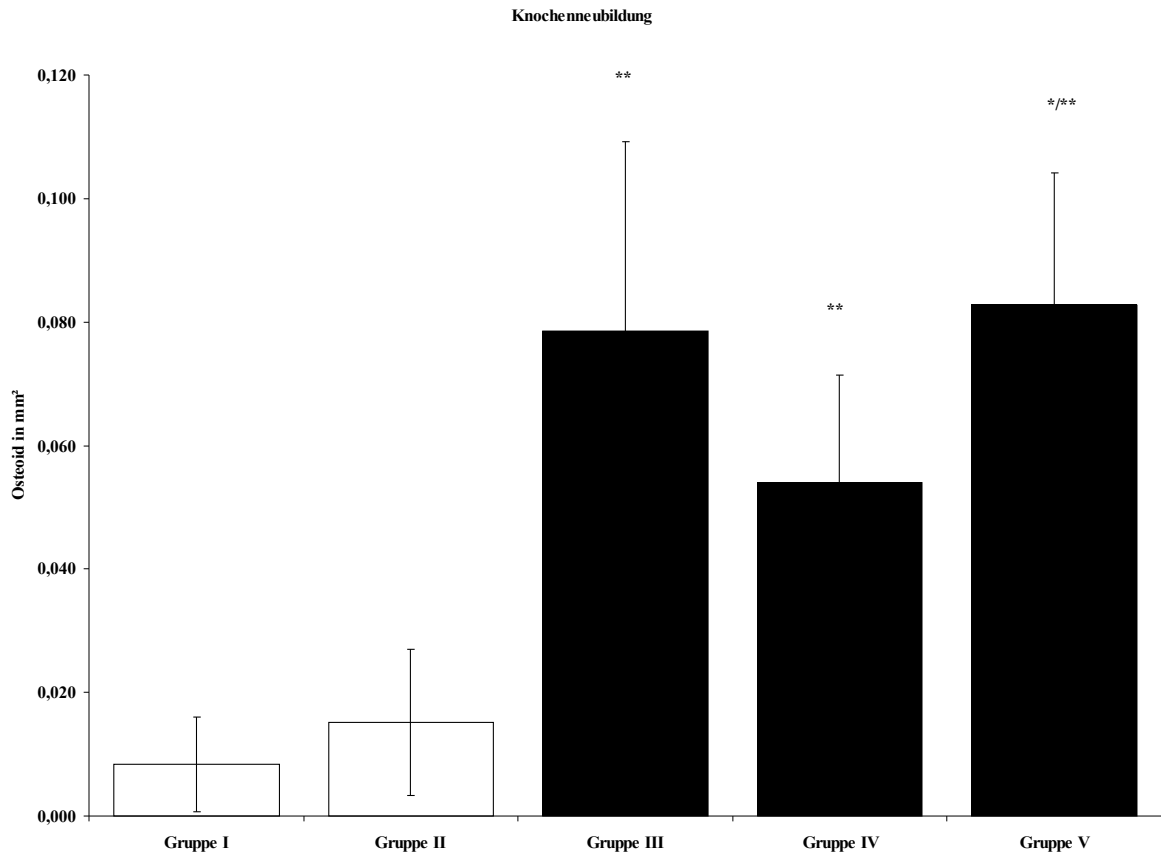
(Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \* =  $p < 0,05$  gegenüber Gruppe I; \*\* =  $p < 0,05$  gegenüber Gruppe II)

### 3.2.5 Knochenneubildung

In Gruppe I wurde in einem Präparat eine Knochenneubildung von  $0,05\text{mm}^2$  gefunden. Daraus folgte eine durchschnittliche Knochenneubildung von  $0,008 \pm 0,008\text{mm}^2$ .

In Gruppe II fand sich in zwei Präparaten eine Knochenneubildung von  $0,08\text{mm}^2$  und  $0,02\text{mm}^2$ . Durchschnittlich fand sich in Gruppe II eine Knochenneubildung von  $0,02 \pm 0,01\text{mm}^2$ . Das Minimum lag bei 0, das Maximum bei  $0,08\text{mm}^2$ .

In Gruppe III konnte in fünf von sieben Präparaten eine Knochenneubildung festgestellt werden. Das Minimum lag bei  $0\text{mm}^2$ , das Maximum mit  $0,22\text{mm}^2$  schon deutlich über den Werten in Gruppe I und II. Für Gruppe III wurde eine durchschnittliche Knochenneubildung von  $0,08 \pm 0,03\text{mm}^2$  errechnet.



**Diagramm 5:** Knochenneubildung

(Mittelwert ± Standardabweichung; \* =  $p < 0,05$  gegenüber Gruppe I; \*\* =  $p < 0,05$  gegenüber Gruppe II)

In Gruppe IV fand sich in sechs von sieben Präparaten eine Knochenneubildung mit einem Minimum von  $0\text{mm}^2$  und einem Maximum von  $0,13\text{mm}^2$ . Die durchschnittliche Knochenneubildung in Gruppe IV betrug  $0,05 \pm 0,02\text{mm}^2$ .

In jedem Präparat der Gruppe V wurde eine Knochenneubildung festgestellt. Das Minimum betrug  $0,02\text{mm}^2$ , das Maximum  $0,18\text{mm}^2$ . Somit ergab sich eine durchschnittliche Knochenneubildung von  $0,08 \pm 0,02\text{mm}^2$ .

Die Knochenneubildung unterschied sich signifikant zwischen Gruppe I und V ( $p=0,041$ ), zwischen Gruppe II und III ( $p=0,041$ ), zwischen Gruppe II und IV ( $p=0,029$ ) und zwischen Gruppe II und V ( $p=0,027$ ).

Nicht signifikant unterschied sich die Knochenneubildung zwischen Gruppe I und II, zwischen Gruppe I und III ( $p=0,085$ ), zwischen Gruppe I und IV ( $p=0,104$ ) sowie zwischen den Gruppe III und IV ( $p=0,462$ ), III und V ( $p=0,930$ ) und IV und V ( $p=0,263$ ).

## 4 Diskussion

Der Hauptgrund für Langzeitkomplikationen bei Totalendoprothesen besteht in der aseptische Prothesenlockerung verursacht durch Partikel-induzierte Osteolysen (Rubash et al. 1998, Schmalzried et al. 1992, Sinha et al. 1998).

Mit dem besseren Verständnis der zellulären und molekularbiologischen Mechanismen der Partikel-induzierten Osteolyse konnten mögliche Kandidaten für die nicht-invasive Intervention zur Verbesserung der Implantatfixierung und Implantathaltbarkeit gefunden werden (Aspenberg et al. 1998, Vonau et al. 2001, Fisher et al. 1999). Antiresorptiv wirkende Arzneimittel, besonders Bisphosphonate mit ihrer gut untersuchten Fähigkeit Osteoklasten-induzierte Knochenresorption zu hemmen, wurden gezielt therapeutisch eingesetzt, um Partikel-induzierte Osteolysen zu unterdrücken (Shanbhag et al. 1997, von Knoch et al. 2004, von Knoch et al. 2005, Venesmaa et al. 2001, Wang et al. 2003).

### 4.1 Versuchsmodell

Das zuerst beschriebene murine Modell für Abrieb-Partikel-induzierte Osteolysen (Merkel et al. 1999) und ein weiteres etabliertes Kalvaria-Modell zur Knochenresorption (Schwarz et al. 2000) basieren auf Polymethylmetacrylat-Partikeln sowie auf Titan-Partikeln. Durch von Knoch et al. 2005 wurde ein Kalvaria-Modell eingeführt, das auf UHMWPE-Partikeln basiert, da das Polyethylen eine der häufigsten und klinisch relevantesten Quellen für Abriebpartikel darstellt und durch Phagozytose der Partikel durch Osteoklasten die osteolytische Kaskade aktiviert wird (Kurtz et al. 1999, Willert et al. 1990). Aus diesem Grund verwendeten wir dieses Modell mit UHMWPE-Partikeln um der klinischen Problematik möglichst nahe zu kommen. In unserer Studie induzierten UHMWPE-Partikel eine deutliche Infiltration der Mittelliniensutur mit Entzündungszellen, Osteoklastenbildung und eine Knochenresorption, die deutlich über der der Kontrollgruppe (Gruppe I) lag.

Einige multinukleäre Zellen zeigten sich TRAP-positiv, obwohl sie lokal keinen Knochen resorbierten. Hingegen haben wir herausgefunden, dass die meisten Resorptionslakunen TRAP-gefärbte Ränder ohne den Nachweis von mehrkernigen Zellen aufweisen. Wir werteten diese als Residualfärbung von Osteoklasten, die zuvor an diesen Stellen aktiv gewesen sind.

Andere Forscher berichteten, dass schon nach sieben Tagen eine merkliche Knochenresorption im murinen Kalvariamodell basierend auf Titanpartikeln gesehen werden konnte (Schwarz et al. 2000). In unserer Studie wurde die Knochenresorption erst

14 Tage nach der Partikelimplantation gemessen. Anstelle von Titanpartikeln verwendeten wir UHMWPE-Partikel, für die vorher gezeigt werden konnte, dass sie eine signifikant stärkere Knochenresorption auslösten als Titanpartikel (von Knoch et al. 2004(14)). Bezieht man diese Erkenntnisse in die Interpretation der Ergebnisse mit ein, so unterschreitet die gemessene Osteoklastenzahl wahrscheinlich die tatsächliche Anzahl an Osteoklasten, die an der Knochenresorption als Antwort auf die Partikelimplantation beteiligt waren.

Wir konnten wie von Knoch et al. 2005 und Schwarz et al. 2000 erneut zeigen, dass die Mittelliniensuturfläche im murinen Osteolysemodell ein sehr geeigneter Analyseparameter zur Bestimmung des Ausmaßes von Osteolysen ist, da die Osteolysen vornehmlich im Bereich der Mittelliniensutur zu finden sind.

## 4.2 Osteoprotegerin

Ein Ungleichgewicht von Schlüsselmediatoren der Osteoklastogenese, RANK, RANKL und Osteoprotegerin, ist in den Prozess der Prothesenlockerung verwickelt (Crotti et al. 2004, Mandelin et al. 2003, Haynes et al. 2001, Kim et al. 2001, Clohisy et al. 2003, Baumann et al. 2004). In unserer Studie konnten wir zeigen, dass exogen zugeführtes OPG im murinen Kalvaria-Modell effektiv Polyethylenpartikel-induzierten Osteolysen vorbeugen und sie reduzieren kann.

Die Osteoklastenanzahl und die Mittelliniensuturfläche als Indikator für die Knochenresorption sowie die außerhalb der Mittelliniensuturfläche gelegenen Osteolysen lagen auf dem Level der Kontrollgruppe, was eine effektive Hemmung von Partikel-induzierter Osteoklastenbildung und Knochenresorption durch OPG anzeigt. Außerdem ist die Tatsache bemerkenswert, dass die durch OPG ausgelösten antiresorptiven Effekte keinen signifikanten Unterschied zwischen sofortiger postoperativer Gabe und einer Gabe nach fünf Tagen postoperativ zeigten. Daraus kann man folgern, dass OPG sowohl die Partikel-induzierte Knochenresorption verhindern, als auch ihr entgegenwirken kann, wenn sie schon begonnen hat.

OPG verhindert Partikel-induzierte Osteolysen durch die Hemmung von erhöhter Osteoklastenrekrutierung und Osteoklastenaktivität, indem es den RANK-RANKL-vermittelten Mechanismus antagonisiert. Dass OPG Abriebpartikel-induzierte Osteoklastenbildung und Osteoklastenfunktion in vivo und in vitro hemmt, ist bereits in zahlreichen aktuellen Studien beschrieben (Crotti et al. 2004, Mandelin et al. 2003, Haynes et al. 2001, Kim et al. 2001, Clohisy et al. 2003, Baumann et al. 2004). Weiterhin betont sie

die Rolle des OPG/ RANKL/ RANK-Systems während der Osteoklasten-Kaskade bei Partikel-induzierter Osteolyse.

Insgesamt haben diese Ergebnisse bedeutende Konsequenzen im Hinblick auf die Langlebigkeit und den letztendlichen klinischen Erfolg von totalem Gelenkersatz. Es wurde rekombinantes Fc-OPG, eine Form des humanen OPG, verwendet, das mit der Fc-Region eines humanen IgG-Antikörper verbunden ist (Morony et al. 1999). Klinisch zeigte Fc-OPG eine lang wirkende Suppression des Knochenumsatzes ohne signifikante Nebeneffekte. In der ersten Phase II Studie für OPG konnten Becker et al. vorteilhafte Effekte von OPG bei postmenopausalen Frauen herausstellen (Becker et al. 2001). Kennzeichnende Botenstoffe für den Knochenumbau und Knochenabbau waren signifikant erniedrigt, und es konnten keine signifikanten Nebenwirkungen festgestellt werden.

Body et al. berichteten in einer Phase I Studie, dass rekombinantes OPG die Knochenresorption bei Plasmozytom- und Brustkrebs-Patienten unterdrückt (Body et al. 2003).

#### 4.3 Statine

Statine, die Klasse der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer, werden klinisch zur Reduktion des Serum-Cholesterols und zur primären und sekundären Prävention von Myokardinfarkten eingesetzt (Farnier et al. 1998). Sie können jedoch auch Osteoklasten-induzierte Knochenresorption in vitro und in vivo unterdrücken (Mundy et al. 1999, Luckman et al. 1998, Staal et al. 2003). Aus diesem Grund stellten wir die Hypothese auf, dass Statine potente Agentien zur Prävention und zur Therapie periprothetischer Knochenresorption sein könnten.

##### *Die Hemmung der Knochenresorption durch Simvastatin*

Unsere Studie zeigt, dass Simvastatin effektiv die UHMWPE-Partikel-induzierten Osteolysen im murinen Kalvaria-Modell unterdrücken kann. Die Simvastatin-Therapie verursacht eine deutliche Reduktion der Partikel-bezogenen Effekte, was sich durch eine signifikante Abnahme der Osteoklastenzahl bestätigt. Diese Erkenntnis wird weiterhin bestätigt durch unsere Messung der Knochenresorption in der Mittelliniensutur, die hoch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne Simvastatin-Behandlung zeigt.

Dass Simvastatin UHMWPE-Partikel-induzierte Osteolysen unterdrücken kann, ist neu. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mechanismen, die diesem Effekt zugrunde liegen, zunächst auf die Hemmung der Osteoklasten-Rekrutierung und der Resorptionsaktivität zurückzuführen sind. Dies entspricht den Ergebnissen zahlreicher Studien, die gezeigt haben, dass Statine die Osteoklastenbildung und Osteoklastenfunktion in vivo und in vitro hemmen. Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass durch Lovastatin die Genese von Mäuse- und Kaninchen-Osteoklasten in vitro gehemmt werden kann (Fisher et al. 1999). Luckmann et al. zeigten in vitro eine durch Mevastatin ausgelöste Apoptose von murinen Osteoklasten (Luckmann et al. 1998). Außerdem berichten Mundy et al. über eine Reduktion der Osteoklastenzahl auf Knochenoberflächen nach der Behandlung mit Simvastatin in vivo (Mundy et al. 1999).

Auf molekularer Ebene wird dem Effekt von Statinen vollständig durch Mevalonat vorgebeugt, sowie weniger effektiv durch Geranylgeraniol (Fisher et al. 1999). In ähnlicher Weise können die anabolen Effekte von Statinen auf den osteoblastischen Knochenaufbau durch die Anwesenheit von Mevalonat überwunden werden (Mundy et al. 1999). Staal et al. zeigten kürzlich, dass das Potenzial verschiedener Statine zur Hemmung der Knochenresorption in vitro mit deren Potenz zur Hemmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität (Staal et al. 2003) korreliert. Zusammengefasst scheint es plausibel, dass die in unserer Studie beobachteten hemmenden Effekte von Simvastatin auf die Partikel-induzierte Knochenresorption ursächlich mit der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase zusammenhängen und letztlich in einer beeinträchtigten Bildung und Funktion der Osteoklasten resultieren. Unsere Studie liefert uns einen weiteren Beweis, dass Statine wie Simvastatin auf den Knochenmetabolismus einwirken, indem sie die osteoklastenvermittelte Knochenresorption in vivo hemmen, obgleich die Hauptwirkung der Statine auf den Knochenstoffwechsel nach allgemeiner Meinung in der Stimulierung der osteoblastenvermittelten Knochenneubildung besteht (Mundy et al. 1999, Song et al. 2003). Umgekehrt wurde kürzlich gezeigt, dass Bisphosphonate, deren Wirkung als Hemmer von osteoklastenvermittelter Knochenresorption gut untersucht ist, die Knochenneubildung stimulieren, indem sie die Rekrutierung von Osteoblasten aus dem Knochenmark steigern (von Knoch F. et al. 2003), deren Proliferation und Reifung stimulieren (Im et al. 2004, Reinholz et al. 2000) und die Apoptose von Osteoblasten hemmen (Plotkin et al. 1999).

*Die Induktion der Knochenneubildung durch Simvastatin*

Wir konnten außerdem zeigen, dass Simvastatin neben seiner antiresorptiven Kapazität unter den Bedingungen der partikelinduzierten Osteolyse deutlich die Knochenneubildung induziert. Es ist bemerkenswert, dass in unserer Studie die Simvastatinapplikation einen 10 fachen, beziehungsweise 5-fachen Anstieg an neuem Osteoidgewebe, verglichen zu den unbehandelten Gruppen ohne (Gruppe 1) und mit Partikelimplantation, zu erkennen war. Dieser anabole Effekt der Simvastatinbehandlung auf die knochenneubildene Aktivität wurde weiter unterstrichen durch einen Anstieg der Knochendicke von 12%, beziehungsweise 30% verglichen zu Gruppe I und II. Diese wichtige neue Erkenntnis zeigt, dass Statine den Knochenmetabolismus günstig bei der partikelinduzierten Osteolyse verändern, so dass nicht nur die Knochenresorption durch eine Unterdrückung der Osteoklastenaktivität, sondern auch eine Stimulation der osteoblastischen Knochenneubildung hervorgerufen wird.

Die Beobachtung, dass Statine, wie zum Beispiel das Simvastatin, die Knochenneubildung unter den Bedingungen der UHMWPE partikelinduzierten Osteolyse hervorrufen können, ist neu. Mundy et al. zeigten zuerst überzeugende Hinweise, dass Statine auch einen Effekt auf den Knochenmetabolismus haben. Unsere Erkenntnisse decken sich mit den publizierten Studien, in denen Statine die osteoblastische Knochenneubildungsaktivität in vitro (Mundy et al. 1999, Li et al. 2003, Maeda et al. 2001, Song et al. 2003, Sugiyama et al. 2000) und in vivo (Mundy et al. 1999, Skoglund et al. 2002) ohne Partikel-induzierte Osteolyse stimulieren. Mundy et al. 1999 konnten zeigen, dass Statine das trabekuläre Knochenvolumen und die Knochenneubildung in ovariectomierten Ratten steigerten. Skoglund et al. 2002 stimulierten ebenfalls mit Statinen die Kallusbildung in einem murinen Frakturmodell. Auf zellulärer Ebene verstärkten Statine die Rekrutierung von Osteoblasten aus dem Knochenmark (Li et al 2003, Song et al. 2003) und unterstützten die Osteoblastenproliferation (Mundy et al. 2000), Differenzierung (Mundy et al. 1999, Maeda et al. 2001, Song et al. 2003) und die Mineralisierung (Maeda et al. 2001) in vitro. Auf molekularer Ebene zeigten Mundy et al., dass Statine, die den Mevalonatstoffwechsel inhibieren, die BMP (bone morphogenic proteins) 2 Expression induzieren, das unter anderem die Osteoblastenaktivität stimuliert (Mundy et al. 1999). BMP 2 ist eines der bekanntesten und potentesten osteokonduktiven Agenzien und ein Wachstumsfaktor, der die Rekrutierung, Proliferation und Differenzierung der osteoblastischen Vorläuferzellen aktiviert und in neuem Osteoidgewebe resultiert (Wozney et al. 1989). In Zusammenhang



mit diesen Erkenntnissen scheint naheliegend, dass unsere Beobachtung der Knochenneubildung unter der Statintherapie durch die Interferenz der Statine im Mevalonatstoffwechsel erklärbar ist.

#### **4.4 Statine und Bisphosphonate im Vergleich**

Statine und Bisphosphonate haben beide ihr Ziel im selben Stoffwechselweg. Sowohl Statine als auch Bisphosphonate wirken auf den Mevalonatstoffwechsel der Cholesterol-Biosynthese ein, indem sie die Prenylierung eines GTP-bindenden Proteins verhindern. Dabei wirken Statine sehr früh durch die Hemmung der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), während der pharmakologische Mechanismus der Amino-Bisphosphonate erst später im Verlauf des Mevalonatstoffwechsels die Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPP) hemmt.

Neue Erkenntnisse zeigen auf, dass Statine auch die Knochenresorption beeinflussen (Fischer et al. 1999, Luckman et al. 1998, Staal et al. 2003, Mundy et al. 1999). Bisphosphonate haben einen knochenanabolen Effekt bei der partikelinduzierten Osteolyse gezeigt (Wedemeyer et al. 2005). Ebenfalls konnten von Knoch et al. 2003 zeigen, dass Bisphosphonate die Rekrutierung der Osteoblasten aus Knochenmarkstromazellen verstärken. Weiter stimulieren sie die Osteoblastenproliferation und Reifung (Im et al. 2004, Reinholz et al. 2000) und inhibieren die Apoptose der Osteoblasten (Plotkin et al. 1999).

Es wurde überlegt, dass beide Medikamente mit unterschiedlichen Seitenwegen des Mevalonatstoffwechsels interagieren, die mit unterschiedlichen Ebenen des Mevalonatstoffwechsels verknüpft sind, was die unterschiedlichen Effekte der Statine und Bisphosphonate auf Osteoblasten und Osteoklasten erklären könnte. Außerdem werden Statine nach ihrer Resorption schnell in der Leber metabolisiert, während Bisphosphonate eine starke Affinität zur Bindung an mineralisierten Knochen, vor allem zum Hydroxyapatit haben, was wenigstens zum Teil die unterschiedliche Wirksamkeit von Statinen und Bisphosphonaten auf den Knochenmetabolismus erklären könnte. Die wachsenden Erkenntnisse über die molekularen Wirkungsmechanismen von Statinen und Bisphosphonaten zeigen, dass der Mevalonatstoffwechsel eine zentrale Rolle im Knochenmetabolismus spielt.

#### **4.5 Grenzen des Modells**

Es sollte berücksichtigt werden, dass unsere Studie auch Grenzen aufweist. Die

Polyethylenpartikel wurden in unserem Versuch einmalig als Bolus in hoher Dosis auf die Schädeldecke gegeben, während in der klinischen Situation ein kontinuierlicher, aber langsamer Abrieb stattfindet. Außerdem fand die experimentelle Partikel-induzierte Knochenresorption in der relativ kurzen Zeit von 14 Tagen statt, während Partikel-induzierte Prothesenlockerungen beim Menschen eine Langzeitkomplikation darstellen, die typischerweise nach Jahren mit kontinuierlicher Bildung von Abriebpartikeln entstehen.

#### **4.6 Ausblick**

Zurzeit gibt es noch keine klinischen Daten über die Effekte von OPG in Bezug auf Abriebpartikel-induzierte Osteolysen bei totalem Gelenkersatz. Es muss sich noch herausstellen, ob unsere Erkenntnisse auf Partikel-induzierte Osteolysen beim Menschen übertragbar sind. Klinische Studien werden letztendlich festlegen, welche Rolle OPG in der nicht invasiven Prävention und Suppression von Abriebpartikel-induzierten periprotektischen Osteolysen beim Menschen zukommt.

Statine werden mit großem Erfolg bei der Senkung des Serumcholesterolspiegels eingesetzt, die Wirkung auf den Knochenmetabolismus muss noch weitergehend untersucht werden. Bauer et al. 2004 berichtet in einer Metaanalyse von vier prospektiven klinischen Studien, dass das Risiko einer Schenkelhalsfraktur bei Frauen durch die Einnahme von Statinen signifikant gesenkt wurde. Bis heute haben wir keine verlässlichen klinischen Daten, wie Statine auf den Knochenturnover bei der durch partikelinduzierte Osteolyse sich lockernden Endoprothese beim Menschen wirken. Einige vorangegangene Studien zeigten, dass Abriebpartikel die osteoblastische Funktion unterdrücken (Lohmann et al. 2000, Vermes et al. 2001, Yao et al. 1997). Zusammengefasst ergeben unsere Erkenntnisse (von Knoch F et al. 2005), dass Statine sowohl durch die Stimulation der Knochenneubildung als auch durch die Unterdrückung der osteoklastischen Knochenresorption einen vorteilhaften Effekt auf die periprotektische partikelinduzierte Osteolyse haben können. Da der hepatische First-pass-Metabolismus der Statine sehr ausgeprägt ist und somit die Bioverfügbarkeit der Statine sehr eingeschränkt ist und somit möglicherweise sehr hohe Dosen appliziert werden müssten, wäre es gut innovative Applikationswege z. B. lokal um das Implantat zu entwickeln, um dort eine höhere Medikamentenkonzentration zu erreichen. Letztendlich sind kontrollierte klinische Studien notwendig um die Rolle der Statine zur Verhinderung und Unterdrückung der partikelinduzierten Osteolyse beim Menschen zu untersuchen.

## 5 Zusammenfassung

Die häufigste Langzeitkomplikation in der Endoprothetik ist die aseptische Prothesenlockerung. Ursache dieser Prothesenlockerung sind Abriebpartikel, die zur Aktivierung einer osteolytischen Kaskade führen. An dieser Kaskade ist unter anderem ein Ungleichgewicht zwischen Osteoprotegerin (OPG), Rezeptor-activator of Nuclear Transcription Factor- $\kappa$ B (RANK) und RANK-Ligand (RANKL) beteiligt. Diese Erkenntnis eröffnete die Möglichkeit mit synthetisch hergestelltem OPG, das knochenprotektiv wirkt, in den Mechanismus der Osteolyse einzugreifen. Für das über den Mevalonatstoffwechsel wirkende Simvastatin waren bereits positive Effekte auf die Osteoporose bei postmenopausalen Frauen nachgewiesen worden. Die Intervention bei der Partikel-induzierten Osteolyse im Maus-Modell war bisher noch nicht Gegenstand einer Untersuchung.

### Material und Methoden

Die Osteolyse wurde im Mauskalvaria-Modell mit Polyethylenpartikeln induziert. Es wurden 5 Gruppen mit jeweils 7 Mäusen des Stammes C57 black/ J6 verwendet. Das Ausmaß der Knochenresorption wurde anhand der Mittelliniensuturfläche in Goldnergefärbten Frontalschnitten gemessen. Als weitere Methode wurden Osteoklasten an TRAP (Tartrat-resistente-saure-Phosphatase) gefärbten Schnitten ausgezählt. Für die statistische Analyse wurden der one-way ANOVA und der Student-t-Test verwendet.

### Ergebnisse

Die Mittelliniensuturfläche bei den Mäusen ohne Partikelimplantation (Gruppe I) war im Mittel  $0,094 \pm 0,02\text{mm}^2$  groß, in Gruppe II  $0,25 \pm 0,065\text{mm}^2$  ( $p=0,018$ ). Die Mittelliniensuturfläche in Gruppe III, die sofort nach der Operation OPG erhalten hatte, betrug  $0,093 \pm 0,034\text{mm}^2$  ( $p=0,0015$ ), die in Gruppe IV, die ab dem 5. postoperativen Tag OPG erhalten hatte, betrug  $0,093 \pm 0,021\text{mm}^2$  ( $p=0,002$ ). Gruppe V, die postoperativ Simvastatin erhalten hatte, zeigte eine Mittelliniensuturfläche von  $0,131 \pm 0,048\text{mm}^2$  ( $p=0,0022$ ). Die Osteoklastenzahl in Gruppe I betrug  $15,3 \pm 9,4$ , in Gruppe II  $48,7 \pm 18,9$  ( $p=0,0085$ ). In Gruppe III und IV lag sie mit  $21,1 \pm 14,9$  und  $3,9 \pm 2,7$  deutlich unter der von Gruppe II ( $p=0,0098$  und  $p=0,0011$ ), ebenso wie Gruppe V mit  $6,2 \pm 8,3$  ( $p=0,00022$ ).

### Schlussfolgerung

Zusammengefasst ergeben die Untersuchungen dieser Studie, dass sowohl die Gabe von Osteoprotegerin als auch die Gabe von Simvastatin die Osteolysen im murinen Kalvaria-Modell hemmen. Weitere Untersuchungen müssen nun zeigen, ob sie zur Prophylaxe und Therapie bei aseptischen Prothesenlockerungen eingesetzt werden können.

## 6 Literatur

1. Amling, M., Neff, L., Priemel, M., Schilling, A.F., Rueger, J.M., Baron, R. (2000): Progressive increase in bone mass and development of odontomas in aging osteopetrotic c-src-deficient mice. *Bone*, 27(5), 603-610.
2. Anderson, M.A., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D., Galibert, L. (1997): A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390, 175-179.
3. Aspenberg, P., Van der His, H. (1998): Fluid pressure may cause periprosthetic osteolysis. Particles are not the only thing. *Acta Orthop Scand* 69(1), 1-4.
4. Bang, F.B. (1956): A bacterial disease of limulus polyphemus. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 98, 325.
5. Bauer, D.C., Mundy, G.R., Jamal, S.A., Black, D.M., Cauley, J.A., Ensrud, K.E., van der Klift, M., Pols, H.A. (2004): Use of statins and fracture: results of 4 prospective studies and cumulative meta-analysis of observational studies and controlled trials. *Arch Intern Med* 164, 146-52.
6. Baumann, B., Rader, C.P., Seufert, J., Noth, U., Rolf, O., Eulert, J., Jakob, F. (2004): Effects of polyethylene and TiAlV wear particles on expression of RANK, RANKL and OPG mRNA. *Acta Orthop Scand* 75, 295-302.
7. Bekker, P.J., Holloway, D., Nakanishi, A., Arrighi, M., Leese, P.T., Dunstan, C.R. (2001): The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 16, 348-360.
8. Body, J.J., Greipp, P., Coleman, R.E., Facon, T., Geurs, F., Femand, J.P., Harousseau, J.L., Lipton, A., Mariette, X., Williams, C.D., Nakanishi, A., Holloway, D., Martin, S.W., Dunstan, C.R., Bekker, P.J. (2003): A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer* 97, 887-892.
9. Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H.L., Xu, W., Lacey, D.L., Boyle, W.J., Simonet, W.S. (1998): Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12, 1260-1268.
10. Canalis, E., Centrella, M., McCarthy, T. (1988): Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J.Clin. Invest.* 81, 1572-1577.

11. Chambers, T. J. (2000): Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J. Pathol.* 192, 4-13.
12. Clohisy, J.C. (2003): Cellular mechanisms of osteolysis. *J Bone Joint Surg* 85-A Suppl 1, 4-6.
13. Clohisy, J.C., Frazier, E., Hirayama, T., Abu-Amer, Y. (2003): RANKL is an essential cytokine mediator of polymethylmethacrylate particle-induced osteoclastogenesis. *J Orthop Res* 21, 202-212.
14. Crotti, T.N., Smith, M.D., Findlay, D.M., Zreiqat, H., Ahern, M.J., Weedon, H., Hatzinikolous, G., Capone, M., Holding, C., Haynes, D.R. (2004): Related Articles, Links Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss: expression of receptor activator NFkappaB, RANK ligand and osteoprotegerin. *Biomaterials* 25, 565-573.
15. Emery, J.G., McDonnell, P., Burke, M.B., Deen, K.C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E.R., Eichmann, C., DiPrinzio, R., Dodds, R.A., James, I.E., Rosenberg, M., Lee, J.C., Young, P.R. (1998): Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273, 14262-14367.
16. Farnier, M., Davignon, J. (1998): Current and future treatment of hyperlipidemia: the role of statins. *Am J Cardiol* 82 (4B), 3J-10J.
17. Fata, J.E., Kong, Y.Y., Li, J., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Moorehead, R.A., Elliot, R., Scully, S., Voura, E.B., Lacey, D.L., Boyle, W.J., Khokha, R., Penninger, J.M. (2000): The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 103, 41-50.
18. Fisher, J.E., Rogers, M.J., Halasy, J.M., Luckman, S.P., Hughes, D.E., Masarachia, P.J., Wesolowski, G., Russell, R.G., Rodan, G.A., Reszka, A.A. (1999): Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 33-38.
19. Fuller, K., Wong, B., Fox, S., Choi, Y., Chambers, T.J. (1998): TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 188, 997-1001.
20. Gerber, H.P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z., Ferrera, N. (1999): VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5, 623-628.
21. Gori, F., Hofbauer, L.C., Dunstan, C.R., Spelsberg, T.C., Khosla, S., Riggs, B.L.

- (2000): The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* 141, 4768-4776.
22. Haynes, D.R., Crotti, T.N., Potter, A.E., Loric, M., Atkins, G.J., Howie, D.W., Findlay, D.M. (2001): The osteoclastogenic molecules RANKL and RANK are associated with periprosthetic osteolysis. *J Bone Joint Surg Br* 83, 902-911.
  23. Hofbauer, L.C., Gori, F., Riggs, B.L., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Spelsberg, T.C., Khosla, S. (1999): Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 140, 4382-4389.
  24. Hofbauer, L.C., Khosla, S., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Spelsberg, T.C., Riggs, B.L. (1999): Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140, 4367-4370.
  25. Hofbauer, L.C., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Spelsberg, T.C., Riggs, B.L., Khosla, S. (1999): Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ , but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 25, 255-259.
  26. Hsu, H., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H.L., Elliott, G., Kelley, M.J., Sarosi, I., Wang, L., Xia, X.Z., Elliott, R., Chiu, L., Black, T., Scully, S., Capparelli, C., Morony, S., Shimamoto, G., Bass, M.B., Boyle, W.J. (1999): Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3540-3545.
  27. Hughes, D.E., Dai, A., Tiffée, J.C., Li, H.H., Mundy, G.R., Boyce, B.F. (1996): Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$ . *Nat Med* 2, 1132-1136.
  28. Im, G.I., Qureshi, S.A., Kenney, J., Rubash, H.E., Shanbhag, A.S. (2004): Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 25, 4105-4115.
  29. Jacobs, J.J., Roebuck, K.A., Archibeck, M., Hallab, N.J., Glant, T.T. (2001): Osteolysis: Basic Science. *Clin Orthop* 393, 71-77.
  30. Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. (1994): *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 14. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; s. bes. S. 274-275.
  31. Kim, K.J., Kotake, S., Udagawa, N., Ida, H., Ishii, M., Takei, I., Kubo, T., Takagi, M.

- (2001): Osteoprotegerin inhibits in vitro mouse osteoclast formation induced by joint fluid from failed total hip arthroplasty. *J Biomed Mater Res* 58, 393-400.
32. Kitazawa, R., Kitazawa, S., Maeda, S. (1999): Promotor structure of mouse RANKL/ TRANCE/ OPGL/ ODF gene. *Biochem Biophys Acta* 1445, 134-141.
  33. Kong, Y-Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Mak, T.W., Boyle, W.J., Penninger, J.M. (1999): OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315-323.
  34. Koolman, J., Röhm, K.-H., Farbtafeln: Wirth, J. (1998): Taschenatlas der Biochemie. 2. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; s.bes. S.166-167.
  35. Kureishi, Y., Luo, Z., Shiojima, I., Bialik, A., Fulton, D., Lefer, D.J., Sessa, W.C., Walsh, K. (2000): The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 6, 1004-1010.
  36. Kurtz, S.M., Muratoglu, O.K., Evans, M., Edidin, A.A. (1999): Advances in the processing, sterilization, and crosslinking of ultra-high molecular weight polyethylene for total joint arthroplasty. *Biomaterials* 20 (18), 1659-1688.
  37. Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., Boyle, W.J. (1998): Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-176.
  38. Lee, S-K., Lorenzo, J.A. (1999): Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 140, 3552-3561.
  39. Levin, J., Bang, F.B. (1968): Clottable protein in Limulus: Its lokalization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 19, 186.
  40. Li, J., Sarosi, I., Yan, X.Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H.L., McCabe, S., Elliot, R., Scully, S., Van, G., Kaufman, S., Juan, S.C., Sun, Y., Tarpley, J., Martin, L., Christensen, K., McCabe, J., Kostenuik, P., Hsu, H., Fletcher, F., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Boyle, W.J. (2000): RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium

- metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 1566-1571.
41. Li, X., Cui, Q., Kao, C., Wang, G.J., Balian, G. (2003): Lovastatin inhibits adipogenic and stimulates osteogenic differentiation by suppressing PPARgamma2 and increasing Cbfa1/Runx2 expression in bone marrow mesenchymal cell cultures. *Bone* 33, 652-659.
  42. Lohmann, C.H., Schwartz, Z., Koster, G., Jahn, U., Buchhorn, G.H., MacDougall, M.J., Casasola, D., Liu, Y., Sylvia, V.L., Dean, D.D., Boyan, B.D. (2000): Phagocytosis of wear debris by osteoblasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition. *Biomaterials* 21, 551-561.
  43. Luckman, S.P., Hughes, D.E., Coxon, F.P., Graham, R., Russell, G., Rogers, M.J. (1998): Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 13, 581-589.
  44. Maeda, T., Matsunuma, A., Kawane, T., Horiuchi, N. (2001): Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 874-877.
  45. Malyankar, U.M., Scatena, M., Suchland, K.L., Yun, T.J., Clark, E.A., Giachelli, C.M. (2000): Osteoprotegerin is an  $\alpha$  v  $\beta$ 3-induced, NF- $\kappa$ B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem* 275, 20959-20962.
  46. Mandelin, J., Li, T.F., Liljestrom, M., Kroon, M.E., Hanemaaijer, R., Santavirta, S., Kontinen, Y.T. (2003): Imbalance of RANKL/RANK/OPG system in interface tissue in loosening of total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br* 85, 1196-1201.
  47. McKellop, H., Shen, F.W., Lu, B., Campbell, P., Salovey, R. (1999): Development of an extremely wear-resistant ultra high molecular weight polyethylene for total hip replacements. *J Orthop Res* 17 (2), 157-167.
  48. Merkel, K.D., Erdmann, J.M., McHugh, K.P., Abu-Amer, Y., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L. (1999): Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis. *Am J Pathol* 154, 203-210.
  49. Morony, S., Capparelli, C., Lee, R., Shimamoto, G., Boone, T., Lacey, D.L., Dunstan, C.R. (1999): A chimeric form of osteoprotegerin inhibits hypercalcemia and bone resorption induced by IL-1beta, TNF-alpha, PTH, PTHrP, and 1, 25(OH)2D3. *J Bone Miner Res* 14, 1478-1485.
  50. Mundy, G.R. (1993): Role of cytokines in bone resorption. *J Cell Biochem* 53 (4), 296-300.



51. Mundy, G.R. (1999). Cellular and molecular regulation of bone turnover. *Bone* 24 (5 Suppl), 35-38.
52. Mundy, G., Garrett, R., Harris, S., Chan, J., Chen, D., Rossini, G., Boyce, B., Zhao, M., Gutierrez, G. (1999): Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 286, 1946-1949.
53. Muratoglu, O.K., Bragdon, C.R., O'Connor, D.O., Jasty, M., Harris, W.H. (2001): A novel method of cross-linking ultra-high-molecular-weight polyethylene to improve wear, reduce oxidation, and retain mechanical properties. Recipient of the 1999 HAP Paul Award. *J Arthroplasty* 16 (2), 149-160.
54. Nicholson, G.C., Moseley, J.M., Sexton, P.M., Mendelsohn, F.A., Martin, T.J. (1986): Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest* 78, 355-360.
55. Plotkin, L.I., Weinstein, R.S., Parfitt, A.M., Roberson, P.K., Manolagas, S.C., Bellido, T. (1999): Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 104, 1363-1374.
56. Premnath, V., Bellare, A., Merrill, E.W., Jasty, M.J., Harris, W.H. (1999): Molecular rearrangements in ultra high molecular weight polyethylene after irradiation and long-term storage in air. *Polymer* 40, 2215-2229.
57. Reinholz, G.G., Getz, B., Pederson, L., Sanders, E.S., Subramaniam, M., Ingle, J.N., Spelsberg, T.C. (2000): Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 60, 6001-6007.
58. Rubash, H.E., Sinha, R.K., Shanbhag, A.S., Kim, S.Y. (1998): Pathogenesis of bone loss after total hip arthroplasty. *Orthop Clin North Am* 29, 173-186.
59. Saika, M., Inoue, D., Kido, S., Matsumoto, T. (2001):  $17\beta$ -Estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor- $\alpha$ . *Endocrinology* 142, 2205-2212.
60. Schmalzried, T.P., Jasty, M.J., Harris, W.H. (1992): Periprosthetic bone loss in total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 74-A, 849-863.
61. Schwarz, E.M., Lu, A.P., Goater, J.J., Benz, E.B., Kollias, G., Rosier, R.N., Puzas, J.E., O'Keefe, R.J. (2000): Tumor necrosis factor-alpha/nuclear transcription factor-kappaB signaling in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 18, 472-480.
62. Shanbhag, A.S., Hasselman, C.T., Rubash, H.E. (1997): The John Charnley Award. Inhibition of wear debris mediated osteolysis in a canine total hip arthroplasty model. *Clin Orthop* 344, 33-43.

- 
63. Shevde, N.K., Bendixen, A.C., Diender, K.M., Pike, J.W. (2000): Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 7829-7834.
64. Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Boyle, W.J. (1997): Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309-319.
65. Sinha, R.K., Shanbhag, A.S., Maloney, W.J., Hasselman, C.T., Rubash, H.E. (1998): Osteolysis: cause and effect. *Instr Course Lect* 47, 307-320.
66. Skoglund, B., Forslund, C., Aspenberg, P. (2002): Simvastatin improves fracture healing in mice. *J Bone Miner Res* 17 (11), 2004-2008.
67. Song, C., Guo, Z., Ma, Q., Chen, Z., Liu, Z., Jia, H., Dang, G. (2003): Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 458-462.
68. Sprecher, C., Schneider, E., Wimmer, M.A. (2003): Generalized size and shape description of UHMWPE wear debris – A comparison of Cross-linked, Enhanced fused, and standard polyethylene Partikles. In: Kurtz, S.M., Gsell, R., Martell, J. (eds). *Crosslinked and thermally treated Ultra-High Molecular weight polyethylene for joint replacements*. ASTM STP 1445. ASTM International, West Conshohocken, PA 2003.
69. Sprecher, C., Wimmer, M.A. (2001): Size independent morphological description of polyethylene particles. *J Biomech* 34, 71.
70. Srivastava, S., Toraldo, G., Weitzmann, M.N., Cenci, S., Ross, F.P., Pacifici, R. (2001): Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J Biol Chem* 276, 8836-8840.
71. Staal, A., Frith, J.C., French, M.H., Swartz, J., Gungor, T., Harrity, T.W., Tamasi, J., Rogers, M.J., Feyen, J.H. (2003): The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res* 18 (1), 88-96.
72. Suda, T., Nakamura, I., Jimi, E., Takahashi, N. (1997): Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* 12 (6), 869-879.
73. Sugiyama, M., Kodama, T., Konishi, K., Abe, K., Asami, S., Oikawa, S. (2000): Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2

- in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 688-692.
74. Takai, H., Kanematsu, M., Yano, K., Tsuda, E., Higashio, K., Ikeda, K., Watanabe, K., Yamada, Y. (1998): Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the production of osteoprotegerin/ osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 273, 27091-27096.
  75. Teitelbaum, S.L., Abu-Amer, Y., Ross, F.P. (1995): Molecular mechanism of bone resorption. *J Cell Biochem* 59, 1-10.
  76. Teitelbaum, S. L. (2000): Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1508-1514.
  77. Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Tanaka, H., Sasaki, T., Nishihara, T., Koga, T., Martin, T.J., Suda, T. (1990): Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 7260
  78. van Beek, E., Lowik, C., van der Pluijm, G., Papapoulos, S. (1999): The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: A clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 14 (5), 722-729.
  79. Venesmaa, P.K., Kroger, H.P., Miettinen, H.J., Jurvelin, J.S., Suomalainen, O.T., Alhava, E.M. (2001): Alendronate reduces periprosthetic bone loss after uncemented primary total hip arthroplasty: a prospective randomized study. *J Bone Miner Res* 16, 2126-2123.
  80. Vermes, C., Chandrasekaran, R., Jacobs, J.J., Galante, J.O., Roebuck, K.A., Glant, T.T. (2001): The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts. *J Bone Joint Surg* 83-A, 201-211.
  81. von Knoch, F., Heckelei, A., Wedemeyer, C., Saxler, G., Hilken, G., Henschke, F., Löer, F., von Knoch, M. (2005): The effect of simvastatin on polyethylene particle-induced osteolysis. *Biomaterials* 26, 3549-3555.
  82. von Knoch, F., Kowalsky, M., Weissbach, L., Im, G., Puskas, B., Fishman, F., Rubash, H.E., Shanbhag, A.S. (2003): Bisphosphonates enhance osteoblastic recruitment from human bone marrow stromal cells in vitro. *Trans Orthop Res Soc* 28, 873.
  83. von Knoch, M., Jewison, D.E., Sibonga, J.D., Sprecher, C., Morrey, B.F., Löer, F., Berry, D.J., Scully, S.P. (2004): The effectiveness of polyethylene versus titanium particles in inducing osteolysis in vivo. *J Orthop Res* 22, 237-243.
  84. von Knoch, M., Sprecher, C., Barden, B., Saxler, G., Löer, F., Wimmer, M. (2004):

- [Size and shape of commercially available polyethylene particles for in-vitro and in-vivo-experiments]. *Z Orthop* 142, 366-70.
85. von Knoch, M., Wedemeyer, C., Pingsmann, A., von Knoch, F., Hilken, G., Sprecher, C., Henschke, F., Barden, B., Löer, F. (2005): The decrease of particle-induced osteolysis after a single dose of bisphosphonate. *Biomaterials* 26, 1803-1808.
  86. Vonau, R.L., Bostrom, M.P., Aspenberg, P., Sams, A.E. (2001): Combination of growth factors inhibits bone ingrowth in the bone harvest chamber. *Clin Orthop* 386, 243-251.
  87. Wang, C.J., Wang, J.W., Weng, L.H., Hsu, C.C., Huang, C.C., Chen, H.S. (2003): The effect of alendronate on bone mineral density in the distal part of the femur and proximal part of the tibia after total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 85-A, 2121-2126.
  88. Wedemeyer, C., von Knoch, F., Pingsmann, A., Hilken, G., Sprecher, C., Saxler, G., Henschke, F., Löer, F., von Knoch M. (2005): Stimulation of bone formation by zoledronic acid in particle-induced osteolysis. *Biomaterials* 26, 3549-3555.
  89. Willert, H.G., Bertram, H., Buchhorn, G.H. (1990): Osteolysis in alloarthroplasty of the hip. The role of ultra-high molecular weight polyethylene wear particles. *Clin Orthop* 258, 95-107.
  90. Willert, H.G., Semlitsch, M. (1977): Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *J Biomed Mater Res* 11, 157-164.
  91. Willert, H.G., Puls, P. (1972): Die Reaktion des Knochens auf Knochenzement bei der Alloarthroplastik der Hüfte. *Achi Orthop Unfall-Chir* 72, 33-71.
  92. Wong, B.R., Josien, R., Young Lee, S., Sauter, B., Li, H-L., Steinman, R.M., Choi, Y. (1997): TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 186, 2075-2080.
  93. Wong, B.R., Rho, J., Arron, J., Robinson, E., Orlinick, J., Chao, M., Kalachikov, S., Cayani, E., Barlett, 3<sup>rd</sup>, F.S., Frankel, W.N., Lee, S.Y., Cho, Y. (1997): TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor family that activates c-jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 272, 25190-25194.
  94. Wozney, J.M. (1989): Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1, 267-280.
  95. Yan, T., Riggs, B.L., Boyle, W.J., Khosla, S. (2000): Regulation of osteoclastogenesis and RANK expression by TGF- $\beta_1$ . *J Cell Biochem* 83, 320-325.

- 
96. Yao, J., Cs-Szabo, G., Jacobs, J.J., Kuettner, K.E., Glant, T.T. (1997): Suppression of osteoblast function by titanium particles. *J Bone Joint Surg* 79-A, 107-112.
97. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizucki, S.I., Yano, K., Fujise, N., Sato, Y., Goto, M., Yamaguchi, K., Kuriyama, M., Kanno, T., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K. (1998): Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/ OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 39, 1329-1337.
98. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Mochizucki, S.I., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Suda, T. (1998): Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/ Osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/ RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3597-3602.
99. Yun, T.J., Chaudhary, P.M., Shu, G.L., Frazer, J.K., Ewings, M.K., Schwartz, S.M., Pascual, V., Hood, L.E., Clarc, E.A. (1998): OPG/ FDCR-1, a TNF-receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J Immunol* 161, 6113-6121.
100. Zhang, F.L., Casey, P.J. (1996): Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* 65, 241-269.

## 7 Anhang

### 7.1 Tabellen

**Tabelle 1: Gruppenverteilung**

Gruppe	Anzahl der Tiere	Operation	Partikel	OPG	Zocor
<b>I</b>	6 + 1 verstorbenes	Ja	Keine	Nein	Nein
<b>II</b>	7	Ja	Polyethylen	Nein	Nein
<b>III</b>	7	Ja	Polyethylen	Ja (postop.)	Nein
<b>IV</b>	7	Ja	Polyethylen	Ja (5. postop. Tag)	Nein
<b>V</b>	7	Ja	Polyethylen	Nein	Ja (postop.)

**Tabelle 2: Mittelliniensuturfläche [mm<sup>2</sup>]**

Abkürzung: Gr1A = Tier A der Gruppe 1

	<b>Gr1A</b>	n.a.	<b>Gr2A</b>	0,25	<b>Gr3A</b>	0,12	<b>Gr4A</b>	0,11	<b>Gr5A</b>	0,08
	<b>Gr1B</b>	0,13	<b>Gr2B</b>	0,14	<b>Gr3B</b>	0,11	<b>Gr4B</b>	0,11	<b>Gr5B</b>	0,08
	<b>Gr1C</b>	0,01	<b>Gr2C</b>	0,34	<b>Gr3C</b>	0,06	<b>Gr4C</b>	0,08	<b>Gr5C</b>	0,16
	<b>Gr1D</b>	0,08	<b>Gr2D</b>	0,26	<b>Gr3D</b>	0,06	<b>Gr4D</b>	0,10	<b>Gr5D</b>	0,11
	<b>Gr1E</b>	0,08	<b>Gr2E</b>	0,24	<b>Gr3E</b>	0,07	<b>Gr4E</b>	0,11	<b>Gr5E</b>	0,10
	<b>Gr1F</b>	0,08	<b>Gr2F</b>	0,21	<b>Gr3F</b>	0,09	<b>Gr4F</b>	0,11	<b>Gr5F</b>	0,20
	<b>Gr1G</b>	†	<b>Gr2G</b>	0,31	<b>Gr3G</b>	0,15	<b>Gr4G</b>	0,05	<b>Gr5G</b>	0,19
<b>Mittelwert</b>		0,09		0,25		0,09		0,09		0,13
<b>Standardabweichung</b>		0,007		0,02		0,01		0,008		0,02

**Tabelle 3: Osteoklastenzahl/ Anzahl TRAP-positive Zellen**

	<b>Gr1A</b>	8,0	<b>Gr2A</b>	65,0	<b>Gr3A</b>	15,3	<b>Gr4A</b>	6,0	<b>Gr5A</b>	1,3
	<b>Gr1B</b>	27,7	<b>Gr2B</b>	39,3	<b>Gr3B</b>	36,8	<b>Gr4B</b>	2,3	<b>Gr5B</b>	3,7
	<b>Gr1C</b>	24,3	<b>Gr2C</b>	60,3	<b>Gr3C</b>	6,3	<b>Gr4C</b>	4,3	<b>Gr5C</b>	15,7
	<b>Gr1D</b>	18,3	<b>Gr2D</b>	45,0	<b>Gr3D</b>	23,0	<b>Gr4D</b>	1,5	<b>Gr5D</b>	0,8

	<b>Gr1E</b>	8,5	<b>Gr2E</b>	20,3	<b>Gr3E</b>	14,3	<b>Gr4E</b>	8,3	<b>Gr5E</b>	1,0
	<b>Gr1F</b>	5,3	<b>Gr2F</b>	36,3	<b>Gr3F</b>	6,8	<b>Gr4F</b>	4,5	<b>Gr5F</b>	0,5
	<b>Gr1G</b>	†	<b>Gr2G</b>	74,8	<b>Gr3G</b>	45,3	<b>Gr4G</b>	0,7	<b>Gr5G</b>	20,5
<b>Mittelwert</b>		15,3		48,7		21,1		3,9		6,2
<b>Standardabweichung</b>		3,6		7,1		5,6		1,0		3,1

Tabelle 4: Gewebeverteilung in Prozent

	<b>Gesamtfläche</b> [mm <sup>2</sup> ]	<b>Knochen</b> [mm <sup>2</sup> ]	<b>Osteoid</b> [mm <sup>2</sup> ]	<b>Knochen – Osteoid</b> [mm <sup>2</sup> ]	<b>Mittelliniensutur- fläche</b> [mm <sup>2</sup> ]	<b>Osteolysen</b> [mm <sup>2</sup> ]	<b>Markraum- fläche</b> [mm <sup>2</sup> ]
<b>GR1A</b>	0,57	0,40	0	0,39	0,06	0,01	0,11
<b>GR1B</b>	2,08	1,72	0	1,72	0,13	0,02	0,21
<b>GR1C</b>	2,05	1,61	0,05	1,55	0,10	0,02	0,32
<b>GR1D</b>	1,64	1,28	0	1,28	0,08	0,02	0,25
<b>GR1E</b>	1,32	1,12	0	1,12	0,04	0,02	0,14
<b>GR1F</b>	2,47	2	0	2	0,08	0,07	0,32
<b>GR1G</b>	†						
<b>Mittelwert</b>	1,69	1,36	0,008	1,34	0,08	0,03	0,23
<b>in Prozent</b>	100%	80,18%	0,49%	79,29%	4,79%	1,48%	13,37%
<b>GR2A</b>	2,91	2,04	0	2,04	0,25	0,25	0,37
<b>GR2B</b>	1,56	1,14	0	1,14	0,14	0,11	0,17
<b>GR2C</b>	2,52	1,60	0	1,60	0,34	0,48	0,27
<b>GR2D</b>	2,56	1,97	0	1,97	0,26	0,08	0,25
<b>GR2E</b>	2,58	2,03	0,08	1,94	0,16	0,16	0,23
<b>GR2F</b>	2,36	1,78	0,02	1,76	0,21	0,16	0,26
<b>GR2G</b>	2,64	1,67	0	1,67	0,31	0,3	0,36
<b>Mittelwert</b>	2,45	1,75	0,02	1,73	0,24	0,22	0,28
<b>in Prozent</b>	100%	71,42%	0,61%	70,61%	9,71%	8,98%	11,02%
<b>GR3A</b>	3,01	2,63	0	2,63	0,12	0,01	0,25
<b>GR3B</b>	2,4	1,97	0,12	1,85	0,11	0,04	0,28
<b>GR3C</b>	2,21	1,95	0,06	1,89	0,06	0,03	0,19
<b>GR3D</b>	2,56	2,21	0,13	2,09	0,06	0,08	0,20
<b>GR3E</b>	2,43	2,18	0,22	2,08	0,07	0,03	0,15
<b>GR3F</b>	2,64	2,24	0	2,24	0,09	0,19	0,12
<b>GR3G</b>	3,1	2,33	0,03	2,33	0,15	0,21	0,41
<b>Mittelwert</b>	2,62	2,22	0,08	2,16	0,09	0,09	0,23
<b>in Prozent</b>	100%	84,73%	3,01%	82,44%	3,44%	3,24%	8,78%
<b>GR4A</b>	2,46	2,05	0,05	2,05	0,11	0,07	0,24
<b>GR4B</b>	2,65	1,97	0,02	1,95	0,11	0,17	0,41
<b>GR4C</b>	1,93	1,62	0,06	1,56	0,08	0,02	0,22
<b>GR4D</b>	2,36	1,99	0	1,99	0,10	0,04	0,24
<b>GR4E</b>	2,37	1,89	0,13	1,77	0,11	0,06	0,32
<b>GR4F</b>	1,90	1,68	0,03	1,65	0,11	0,02	0,10
<b>GR4G</b>	2,36	2,02	0,10	1,92	0,05	0,03	0,25

<b>Mittelwert</b>	2,28	1,89	0,05	1,84	0,09	0,06	0,25
<b>in Prozent</b>	100%	82,48%	2,18%	80,4%	3,93%	2,62%	10,92%
<b>GR5A</b>	2,73	2,35	0,06	2,29	0,08	0,10	0,21
<b>GR5B</b>	2,56	2,17	0,01	2,16	0,08	0,09	0,23
<b>GR5C</b>	1,96	1,57	0,08	1,49	0,13	0,08	0,18
<b>GR5D</b>	2,31	1,94	0,04	1,90	0,11	0,04	0,22
<b>GR5E</b>	2,31	1,93	0,07	1,83	0,10	0,04	0,25
<b>GR5F</b>	2,92	2,32	0,18	2,14	0,2	0,14	0,26
<b>GR5G</b>	3,00	2,21	0,14	2,07	0,19	0,23	0,37
<b>Mittelwert</b>	2,54	2,07	0,08	1,98	0,13	0,1	0,25
<b>in Prozent</b>	100%	81,5%	3,15	77,95%	5,12%	3,94%	9,84%

Tabelle 5: Knochendicke [mm]

	<b>Gr1A</b>	n.a.	<b>Gr2A</b>	0,20	<b>Gr3A</b>	0,22	<b>Gr4A</b>	0,21	<b>Gr5A</b>	0,28
	<b>Gr1B</b>	0,21	<b>Gr2B</b>	0,16	<b>Gr3B</b>	0,23	<b>Gr4B</b>	0,24	<b>Gr5B</b>	0,22
	<b>Gr1C</b>	0,23	<b>Gr2C</b>	0,17	<b>Gr3C</b>	0,24	<b>Gr4C</b>	0,22	<b>Gr5C</b>	0,24
	<b>Gr1D</b>	0,23	<b>Gr2D</b>	0,18	<b>Gr3D</b>	0,21	<b>Gr4D</b>	0,21	<b>Gr5D</b>	0,21
	<b>Gr1E</b>	0,18	<b>Gr2E</b>	0,20	<b>Gr3E</b>	0,23	<b>Gr4E</b>	0,23	<b>Gr5E</b>	0,22
	<b>Gr1F</b>	0,22	<b>Gr2F</b>	0,19	<b>Gr3F</b>	0,21	<b>Gr4F</b>	0,21	<b>Gr5F</b>	0,25
	<b>Gr1G</b>	†	<b>Gr2G</b>	0,19	<b>Gr3G</b>	0,24	<b>Gr4G</b>	0,23	<b>Gr5G</b>	0,25
<b>Mittelwert</b>		0,21		0,18		0,23		0,22		0,24
<b>Standardabweichung</b>		0,007		0,005		0,005		0,004		0,009

Tabelle 6: Knochenneubildung [mm<sup>2</sup>]

	<b>GR1A</b>	0	<b>GR2A</b>	0	<b>GR3A</b>	0	<b>GR4A</b>	0,05	<b>GR5A</b>	0,06
	<b>GR1B</b>	0	<b>GR2B</b>	0	<b>GR3B</b>	0,12	<b>GR4B</b>	0,02	<b>GR5B</b>	0,02
	<b>GR1C</b>	0,05	<b>GR2C</b>	0	<b>GR3C</b>	0,06	<b>GR4C</b>	0,06	<b>GR5C</b>	0,08
	<b>GR1D</b>	0	<b>GR2D</b>	0	<b>GR3D</b>	0,13	<b>GR4D</b>	0	<b>GR5D</b>	0,04
	<b>GR1E</b>	0	<b>GR2E</b>	0,08	<b>GR3E</b>	0,22	<b>GR4E</b>	0,13	<b>GR5E</b>	0,07
	<b>GR1F</b>	0	<b>GR2F</b>	0,02	<b>GR3F</b>	0	<b>GR4F</b>	0,03	<b>GR5F</b>	0,18
	<b>Gr1G</b>	†	<b>GR2G</b>	0	<b>GR3G</b>	0,03	<b>GR4G</b>	0,10	<b>GR5G</b>	0,14
<b>Mittelwert</b>		0,008		0,02		0,08		0,05		0,08
<b>Standardabweichung</b>		0,008		0,01		0,03		0,02		0,02





## **8 Danksagungen**

Mein größter Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. Marius von Knoch, der mir das Thema dieser Arbeit überlassen hat und der mir jederzeit meine Fragen in atemberaubender Schnelle beantwortet hat.

Vielen Dank an die Firma Amgen, Thousand Oaks, Californien, USA für die Bereitstellung des Osteoprotegerins.

Ein großes Dankeschön an Herrn Professor Dr. med. Franz Löer für die Möglichkeit, in seiner Abteilung meine Dissertation zu schreiben sowie für das „Daumendrücken“ zum guten Gelingen meiner Dissertation.

Vielen Dank an Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Gero Hilken für seine Hilfe bei der Durchführung der Operation und Herrn Büttner für die Hilfe bei der Bestellung des Simvastatin-Futters. Außerdem einen herzlichen Dank an das Team des Zentralen Tierlabors der Uni Duisburg-Essen für die hervorragende Pflege der Mäuse.

Großen Dank an Herrn Privatdozent Dr. med. Frank Henschke, Leiter des Pathologischen Instituts am St. Johannisstift Paderborn und ganz besonderen Dank an Frau Sylvia Marks und Frau Henschke für die hervorragende Anleitung und Hilfe bei der Aufbereitung der Mäusekalvaria und der Herstellung und Färbung der Knochenschnitte.

Lieben Dank an Frank Petrat für seine Hilfe bei der Aufreinigung der Polyethylenpartikel und die Bereitstellung eines Laborarbeitsplatzes im Institut für Biochemie für die Durchführung des Limulus Assays.

Vielen Dank an Herrn Professor Dr. med. Karl-Heinz Schmid, Direktor des Instituts für Pathologie der Uni Duisburg-Essen, für die Überlassung des Mikroskop-Arbeitsplatzes.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Dr. med. Christian Wedemeyer, der mich während meiner Doktorarbeit betreut und stets darauf geachtet hat, dass die Arbeit noch vor dem 3. Staatsexamen fertiggestellt ist.

Vielen lieben Dank an meine Eltern und meine Schwester für die Durchsicht und sprachliche Korrektur meiner Dissertation.

Ein herzliches Dankeschön an Anett und Markus Blensekemper ebenfalls für die sprachliche Korrektur der Arbeit.

Allen, die hier nicht namentlich erwähnt wurden, die mich jedoch jederzeit unterstützt haben, sei herzlich Danke gesagt.

## 9 Lebenslauf

Name: Anja Heckelei  
Wohnort: Essen  
Geburtsdatum: 29. Juli 1980  
Geburtsort: Bottrop  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Konfession: römisch-katholisch  
Familienstand: ledig  
Mutter: Ursula Johanna Heckelei, geb. Diricks, Kommunalbeamtin  
Vater: Dr. med. Wilhelm Heckelei, Facharzt für Chirurgie und Plastische Chirurgie, Zusatzbezeichnung Handchirurgie  
Geschwister: Claudia Heckelei

### Ausbildungsgang:

Schulausbildung: Besuch der Ludgerusgrundschule in Bottrop von 1986 bis 1990

1990 Wechsel zum Josef-Albers-Gymnasium,  
Besuch des Gymnasiums bis zum Abitur am 12.06.1999

Studium: seit 01. Oktober 1999  
Studium im Fachbereich Medizin an der Universität Duisburg-Essen

Ärztliche Vorprüfung am 29.08.2001 in Essen  
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 29.08.2002 in Essen  
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 09.09.2004 in Essen  
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 30.11.2005 in Essen

Krankenpflegepraktika :  
vom 14.06. - 13.07.1999 im Knappschafts Krankenhaus in Bottrop  
und vom 02.08. - 31.08.1999 im St.Barbara-Hospital in Duisburg

- Famulaturen: vom 18.02. - 22.03.2002 bei Dr. med. Hans Vogelsang, Facharzt für Allgemeinmedizin in Duisburg
- vom 05.09. - 05.10.2002 in der Allgemeinen Chirurgie, Krankenhaus Semashko, Staatliche Medizinische Akademie, Nishnij Nowgorod, Russland
- vom 15.02. - 16.03.2003 im Department of Orthopedic Surgery der Mayo Clinic Rochester, Minnesota, USA
- vom 16.02. - 16.03.2004 in der Plastischen - und Handchirurgie des St. Barbara-Hospitals, Duisburg-Hamborn
- Praktisches Jahr: 1. Tertial: Chirurgie  
Vom 18.10.2004 bis zum 12.12.2004 in der Klinik für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Essen  
Vom 13.12.2004 bis zum 06.02.2005 in der Klinik für Allgemein- und Transplantationschirurgie, Universitätsklinikum Essen
2. Tertial: Orthopädie  
Vom 07.02.2005 bis zum 29.05.2005 in der Klinik für Orthopädie des Universitätsklinikum Essen im Evangelischen Krankenhaus Essen-Werden
3. Tertial: Innere Medizin  
Vom 30.05.2005 bis zum 18.09.2005 im Universitätsklinikum Essen in den Abteilungen für Kardiologie, Hämatologie und Endokrinologie
- Sonstiges: Sprachkenntnisse in Englisch und Französisch
- Bescheinigung über den „Fachgerechten Umgang mit den kleinen Labortieren Maus, Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen“